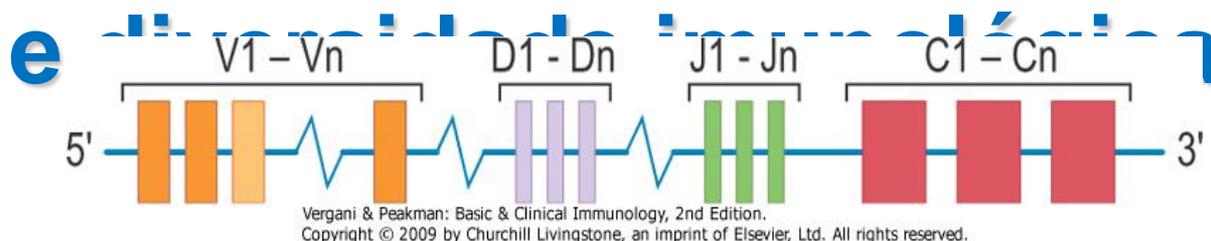




Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Geração do repertório de linfócitos B e T

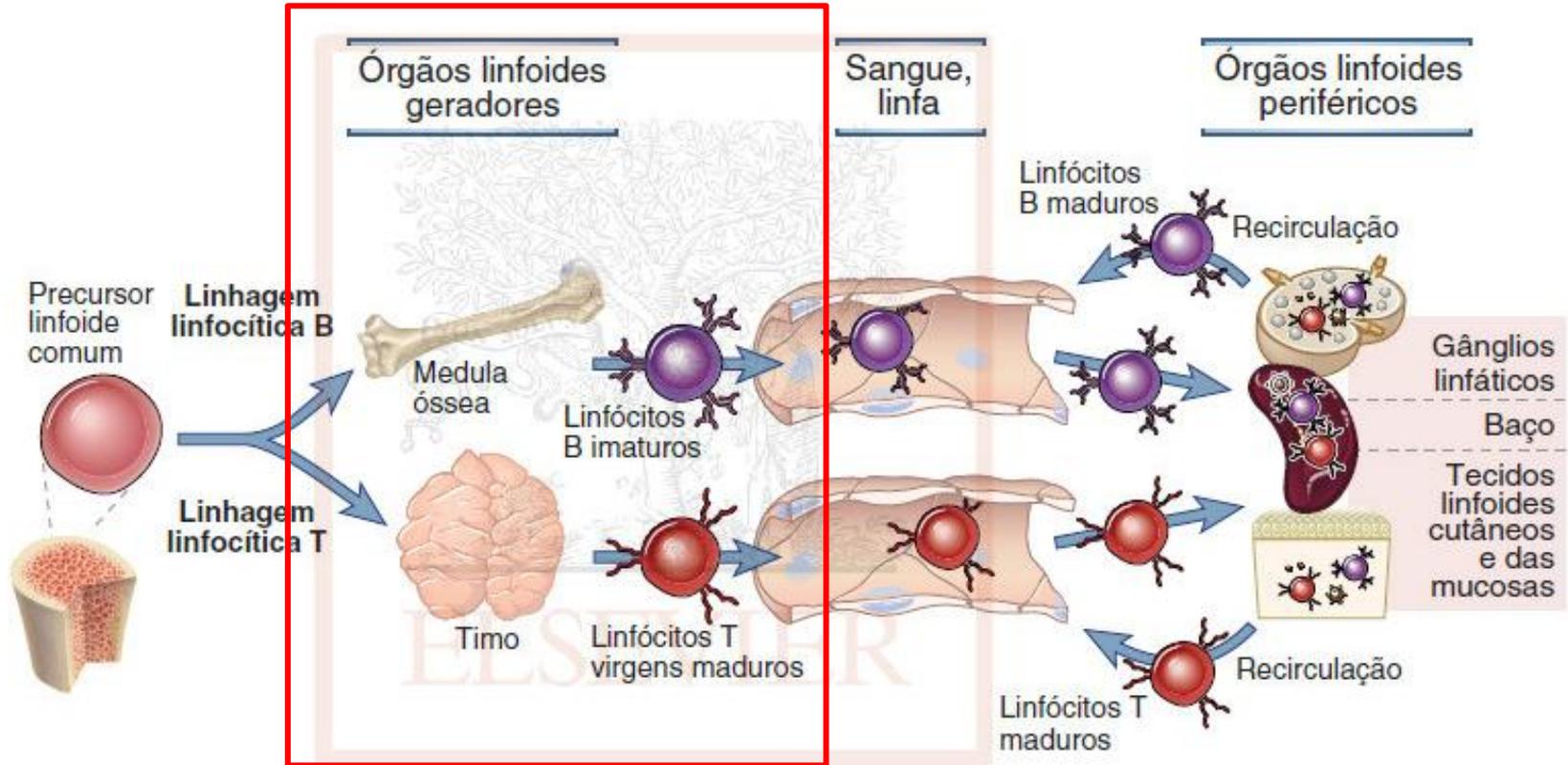


Dra. Daniela Carlos Sartori
danicar@usp.br
Ramal: 4532/4538

30/03/2023
Ribeirão Preto

Maturação de linfócitos

Maturação de linfócitos: O processo pelo qual progenitores dos linfócitos (B e T) se diferenciam em linfócitos maduros (**linfócitos B ocorre na medula óssea e linfócitos T no timo**)



Tem 2 funções distintas:

- Promovem a proliferação de progenitores linfóides (reservatório)
- Rearranjo sequencial e ordenado dos genes de receptores

Propriedades dos linfócitos

CARACTERÍSTICA	SIGNIFICADO FUNCIONAL
ESPECIFICIDADE	Garante que antígenos distintos desencadeiem resposta específicas
DIVERSIDADE	Capacita o sistema imunológico a responder a uma grande variedade de antígenos
MEMÓRIA	Conduz a respostas intensificadas a exposições repetidas ao mesmo antígeno
EXPANSÃO CLONAL	Aumenta o número de linfócitos antígeno-específicos para que se mantenham atualizados com os microrganismos
ESPECIALIZAÇÃO	Gera respostas que são ideais para defesa contra diferentes tipos de microrganismos
CONTRAÇÃO E HOMEOSTASIA	Permite ao sistema imunológico responder a novos antígenos encontrados
TOLERÂNCIA A ANTÍGENOS PRÓPRIOS	Evita lesão do hospedeiro durante resposta a antígenos próprios (auto-Ags)

Etapas da maturação de linfócitos

Envolve uma série de eventos:

- 1) **Comprometimento de células progenitoras com a linhagem B ou T (fatores de transcrição);**
- 2) Proliferação de progenitores imaturos em estágios iniciais;
- 3) Rearranjo ou recombinação sequencial de genes e expressão dos receptores de antígenos (**diversidade e especificidade**);
- 4) Seleção (positiva e negativa) de linfócitos (**não reatividade ao próprio**);
- 5) Diferenciação de células B e T em subpopulações funcionais distintas (**especialização**).

Ontogenia de linfócitos B e T

A) Produção de células B e T imaturos (progenitor linfóide comum-CLP):

progenitor origina a linhagem linfocítica
(linfócitos T e B)

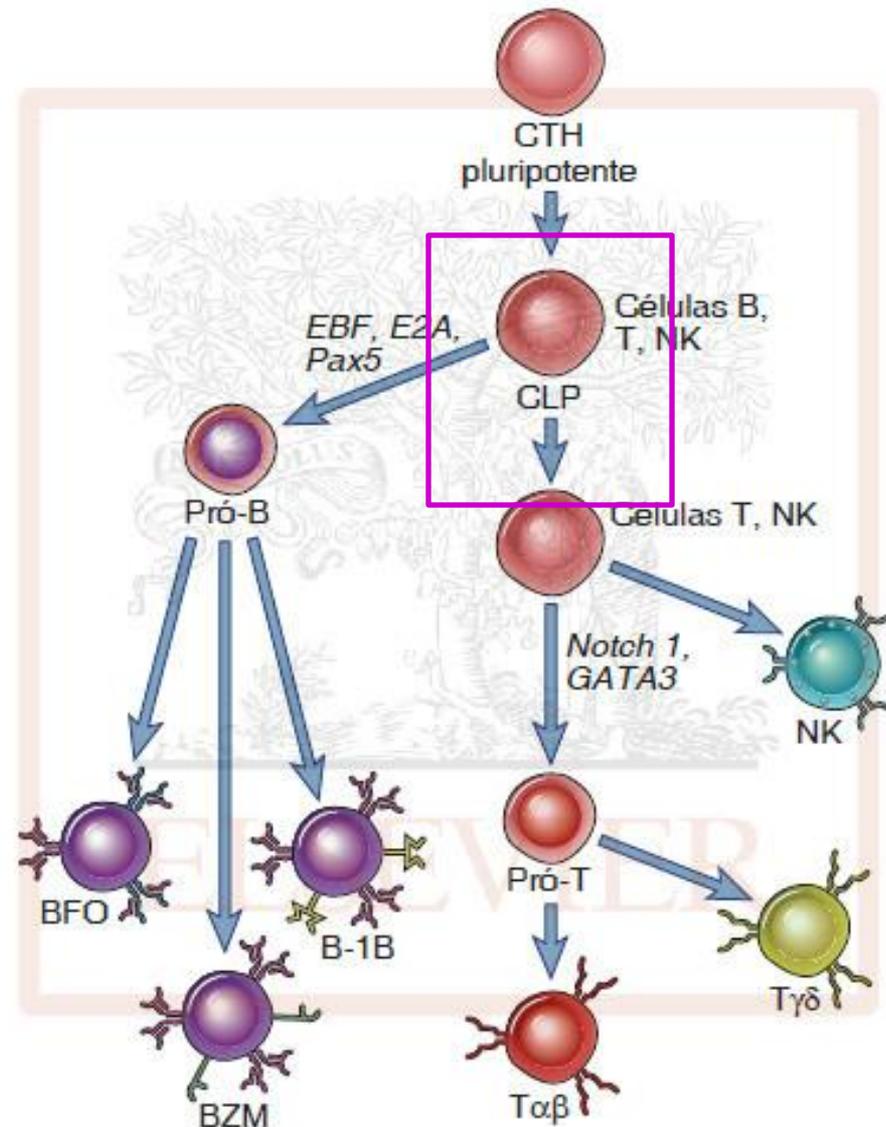
B) Maturação de linfócitos B (Pró-B):

- Linfócitos B foliculares ou recirculantes (**BFO**)
- Linfócitos B da zona marginal do baço (**BZM**)
- Linfócitos B1 (**B1**)

C) Maturação de linfócitos T (Pró-T):

- Linfócitos T ($\alpha\beta$)
- Linfócitos T ($\gamma\delta$)

CTH : Células tronco hematopoiéticas



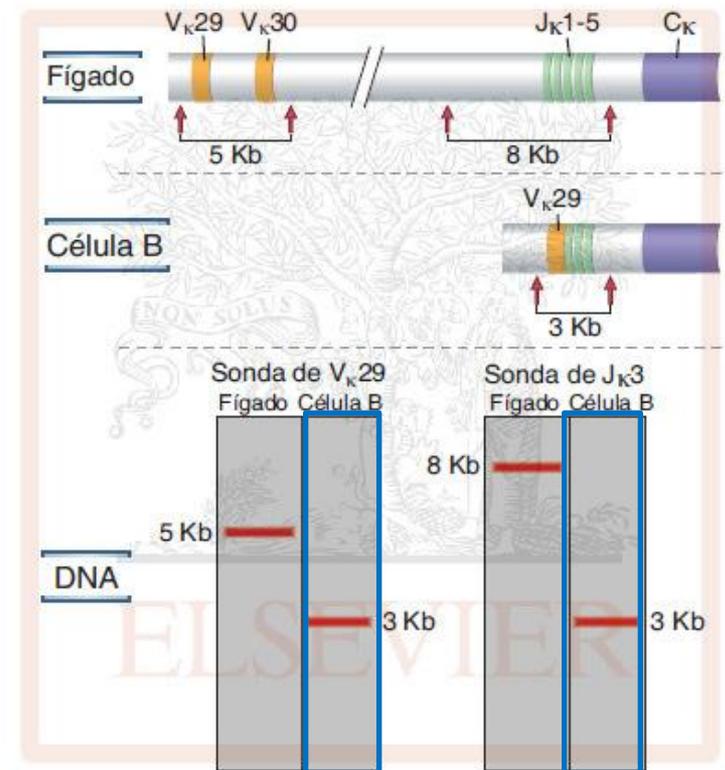
Descoberta dos genes dos receptores

1965: Cada cadeia do anticorpo é codificada por pelo menos 2 genes (um variável e um constante), que são combinados a nível de DNA para originar as proteínas Ig funcionais.

Susumu Tonegawa (1987): a estrutura de genes das Ig em células de um tumor que produz anticorpos, denominado **mieloma (linfócitos B)**, é diferente daquela em tecidos não linfóides.

1) Clivagem do DNA com enzimas de restrição

2) Identificação da região V ou J por hidridização com sondas específicas



Segmentos gênicos que codificam a IgM

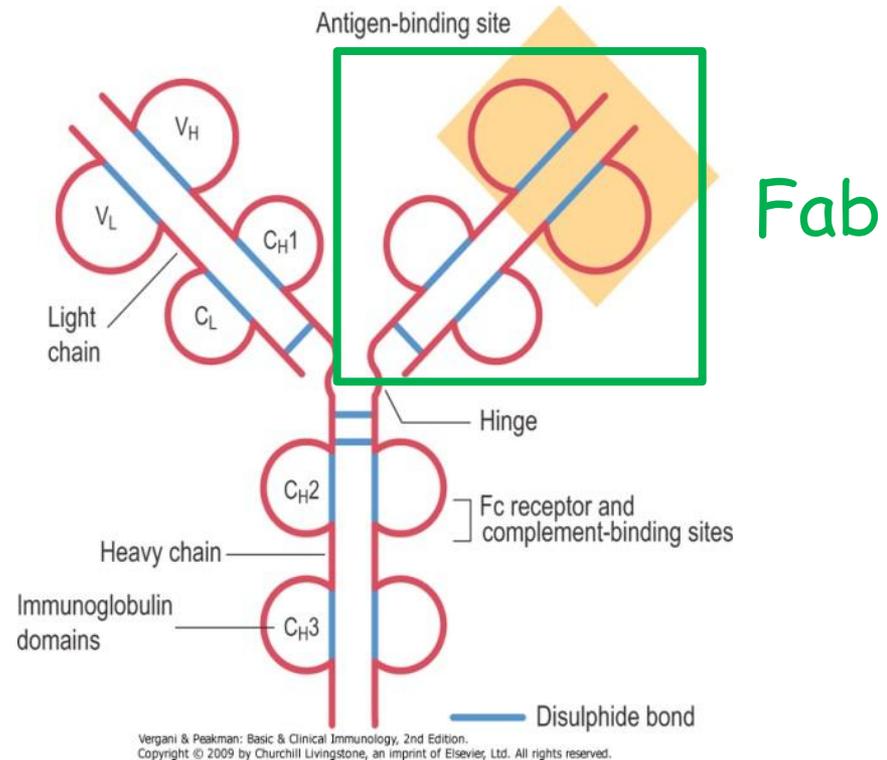
BCR (4 cadeias polipeptídicas)

BCR

2 Cadeias
leve

2 Cadeias
pesada

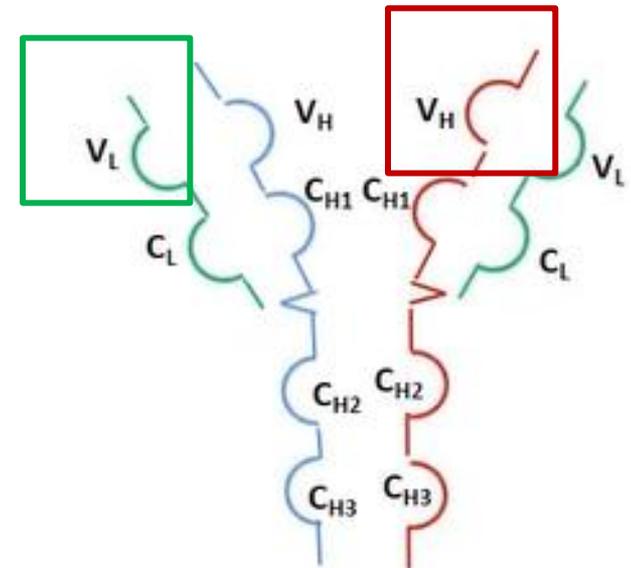
V: variável
C: constant
L: light (leve)
H: heavy (pesada)



Vergani & Peakman: Basic & Clinical Immunology, 2nd Edition.
Copyright © 2009 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier, Ltd. All rights reserved.

Segmentos gênicos

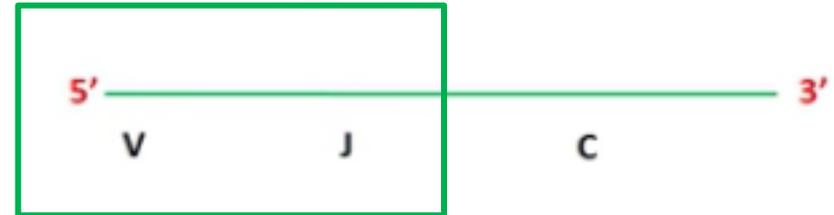
Recombinação VDJ: O processo que recombina diferentes segmentos gênicos da cadeia pesada (V, D, J) ou leve (V e J) em sequências codificantes completas para formação dos receptores de células B e T.



Cadeia Pesada



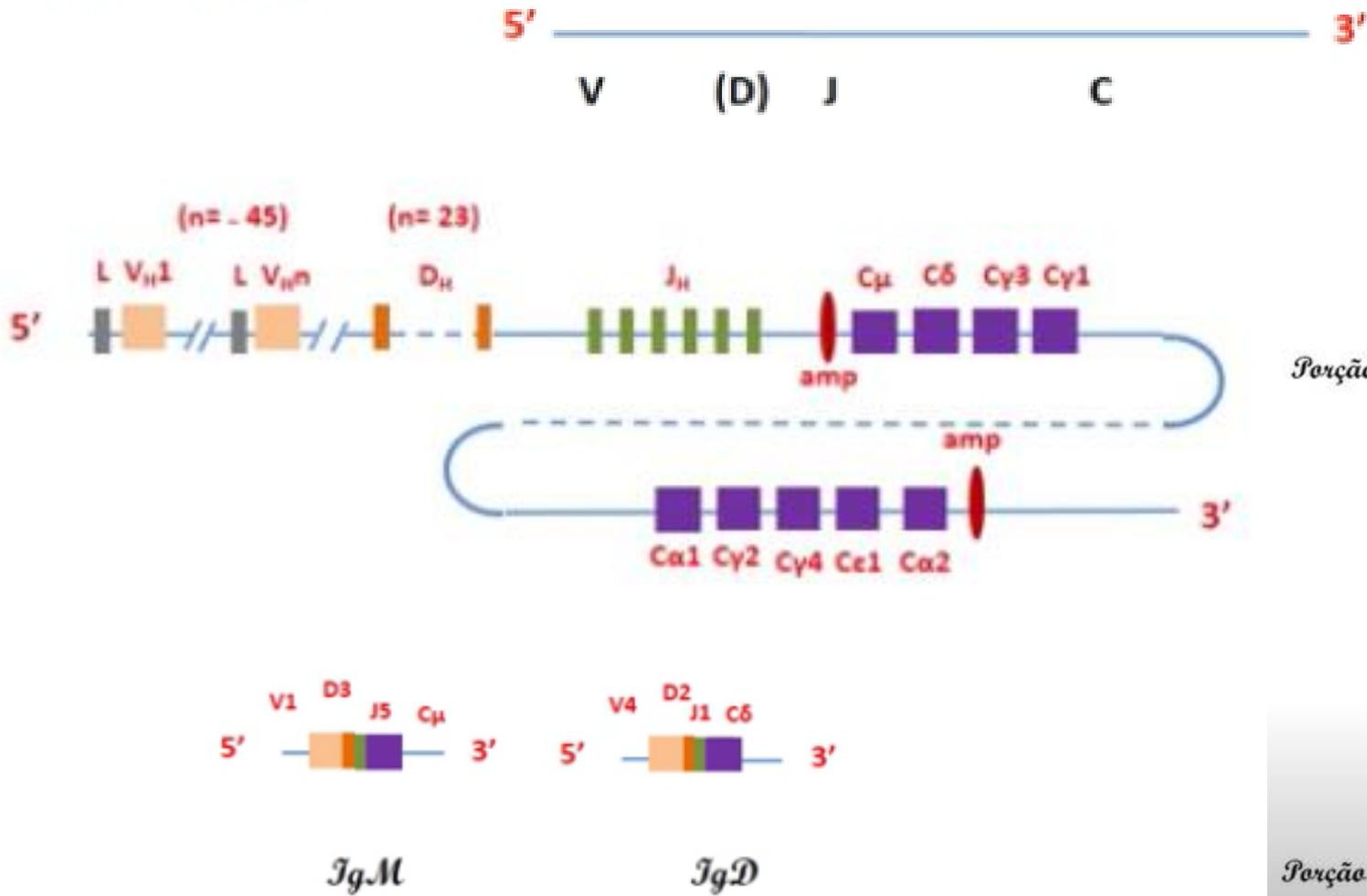
Cadeia Leve



Locus da cadeia pesada da Ig

1250 Kb

Cromossomo 14



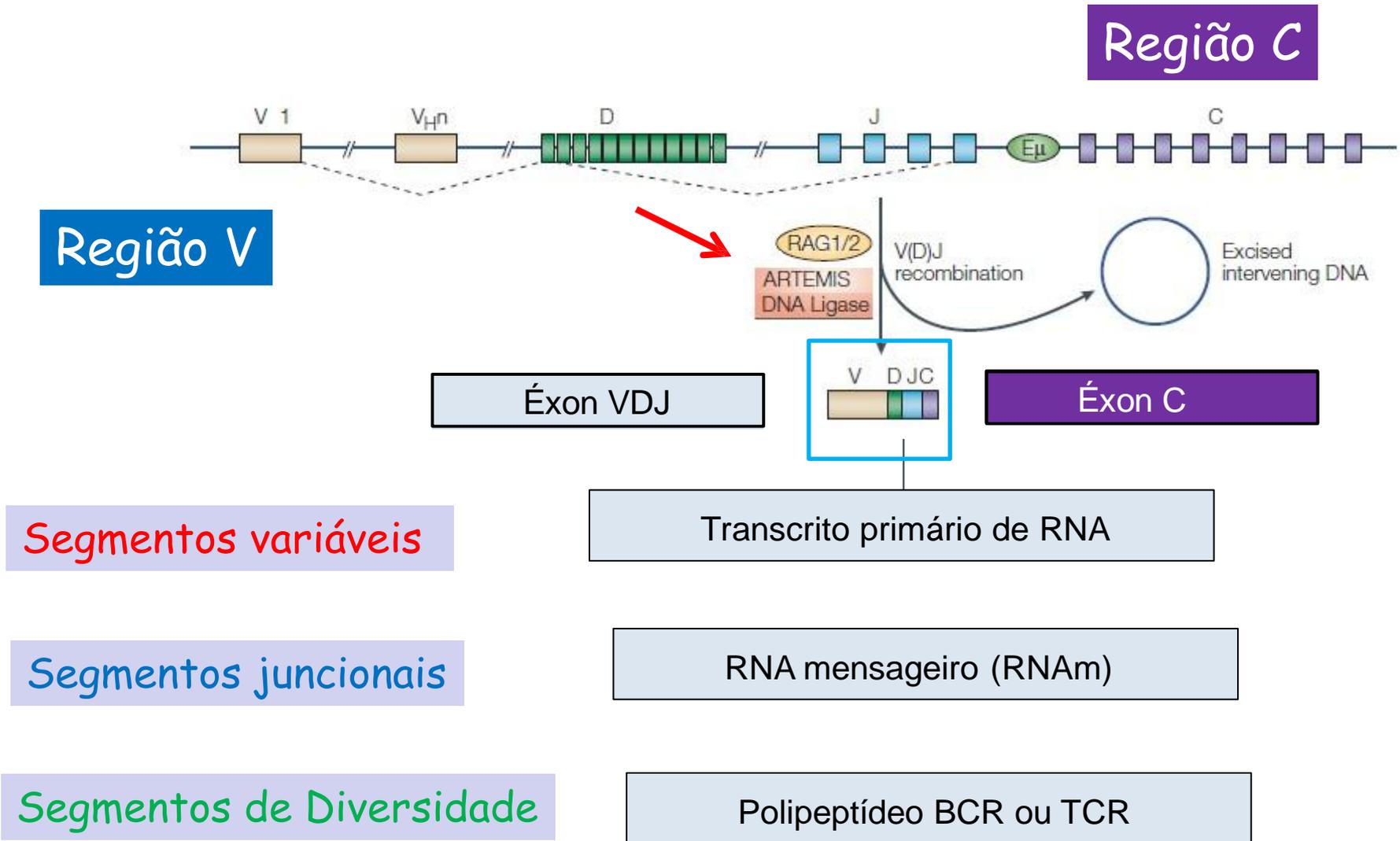
Porção constante da Cadeia Pesada

- α1 → IgA1
- α2 → IgA2
- δ → IgD
- ε → IgE
- γ1 → IgG1
- γ2 → IgG2
- γ3 → IgG3
- γ4 → IgG4
- μ → IgM

Porção constante da Cadeia Leve

κ
λ

Processo de recombinação (VDJ)

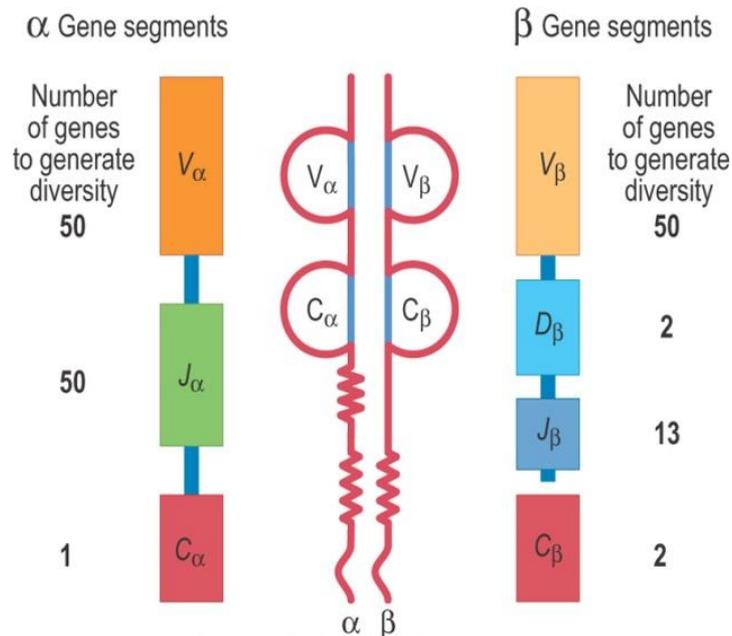


Complexo RAG1/2 (recombinase VDJ): endonucleases de restrição (enzimas) codificadas por genes ativadores de recombinação RAG1 e RAG2

Diversidade combinatória

Diversidade combinatória:

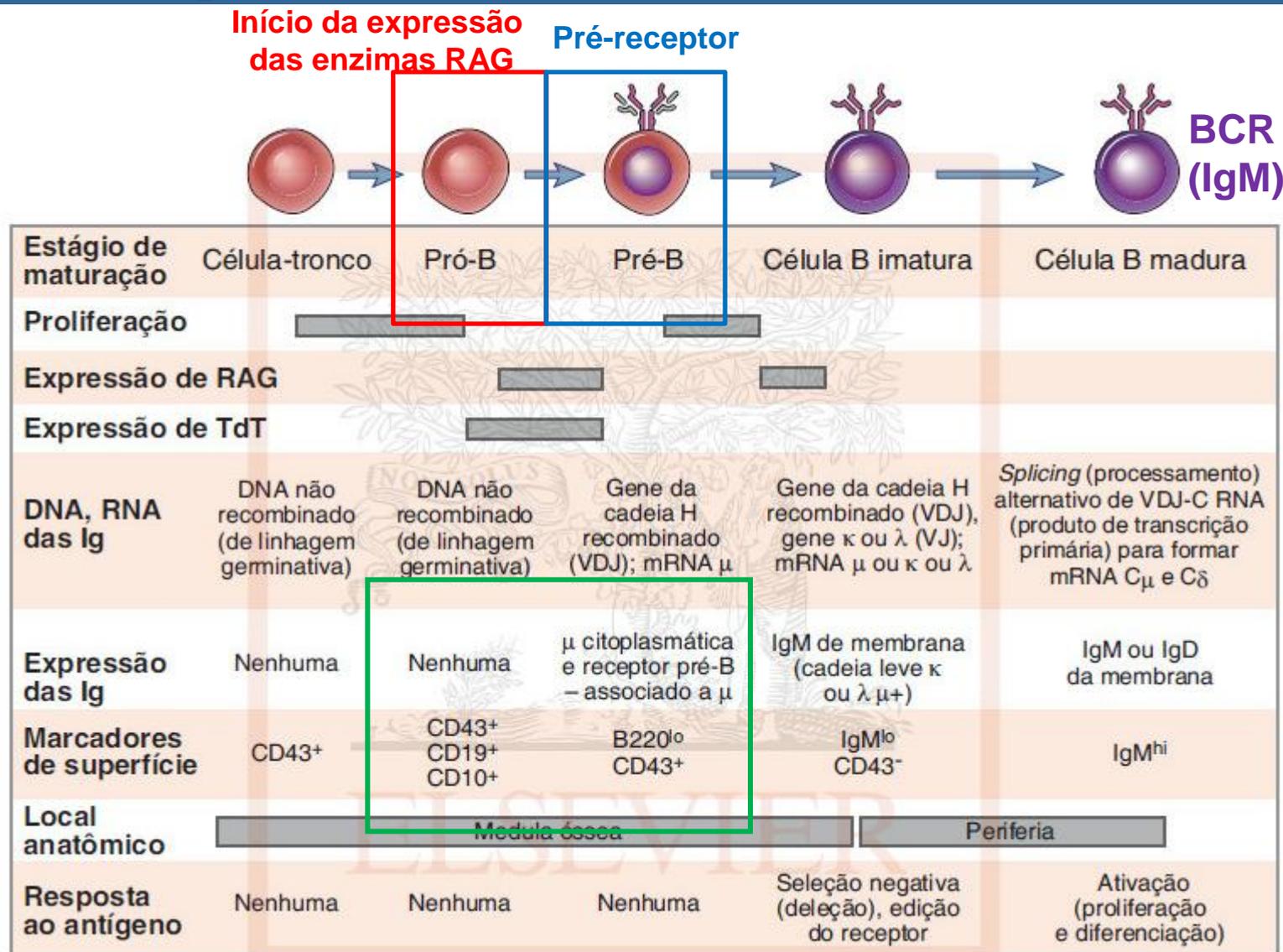
- 1) Associação de múltiplos segmentos gênicos V, D e J da linhagem germinativa que produzem diferentes receptores de antígenos.
- 2) Justaposição de duas regiões V diferentes geradas aleatoriamente (ou seja, V_H e V_L nas moléculas de Ig e V_α e V_β nas moléculas de TCR) para constituir **o sítio de ligação ao antígeno**.



Vergani & Peakman: Basic & Clinical Immunology, 2nd Edition.
Copyright © 2009 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier, Ltd. All rights reserved.

$1,9 \times 10^6$ diferentes especificidades antigênicas

Estágios de maturação do linfócitos B: Pró-B



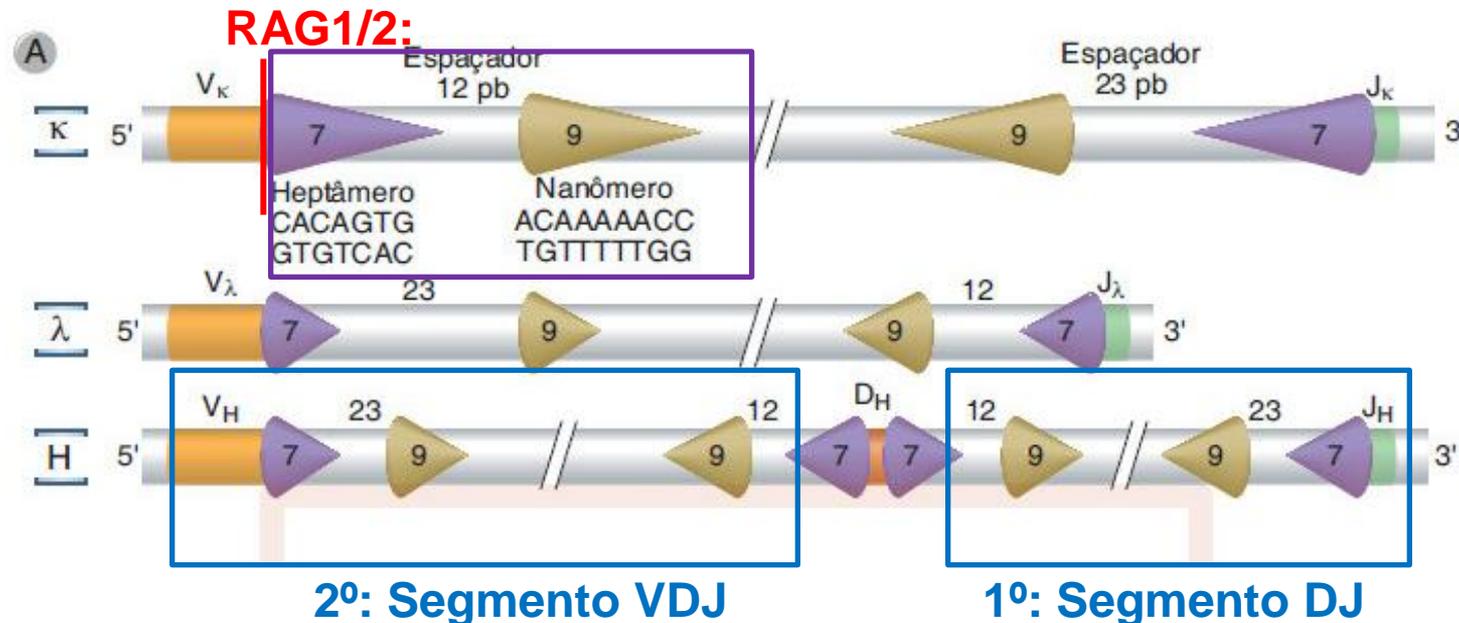
Estágio pré-linfócito: expressão de um pré-receptor de antígeno (apenas uma das cadeias definitiva (pesada) e outra substituta (leve))

Recombinação VDJ

RSS: Sequências de sinais de recombinação que consiste de um **heptâmero** (7 nucleotídeos) seguido de espaçadores (12/23) e um **nanômero** (9 nucleotídeos)

Complexo RAG1/2: A RAG1 é uma recombinase (endonuclease) que reconhece a sequência de DNA entre as RSS e um segmento de codificação V ou J e aproxima estes segmentos gênicos.

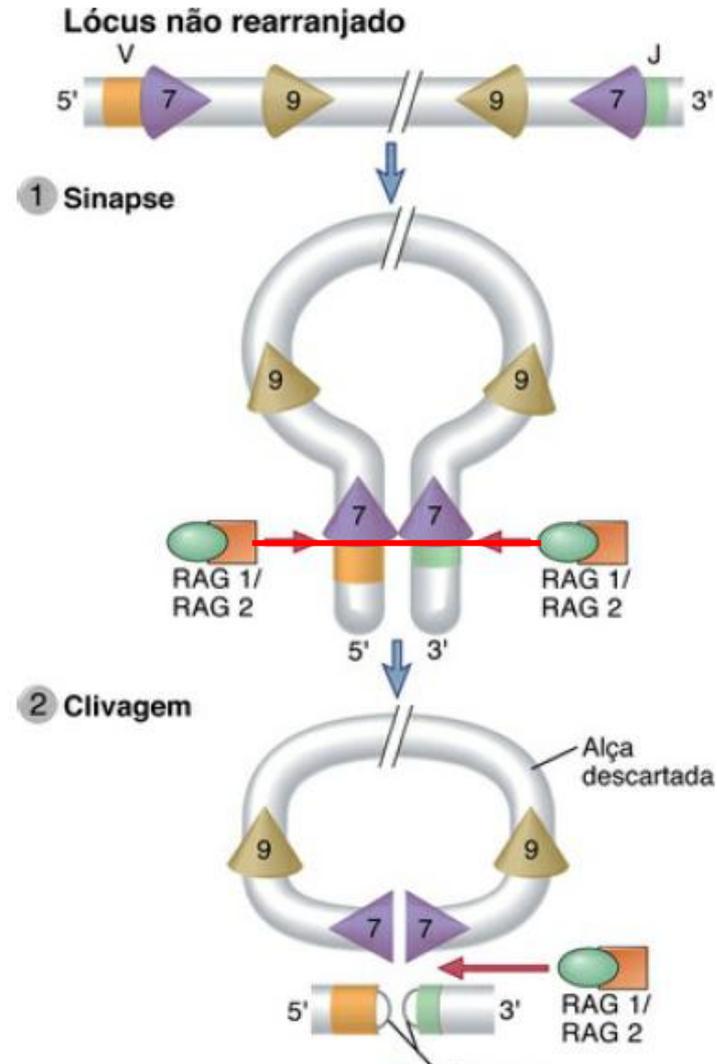
Regra 12/23: Um segmento gênico codificante flanqueado por um espaçador de RSS de 12 pb geralmente poderá unir-se apenas a um gene flanqueado por um espaçador RSS de 23 pb.



Eventos sequenciais: sinapse e clivagem

1) Sinapse: Dois segmentos codificadores selecionados e suas RSS são aproximadas (**alça cromossômica**)

2) Clivagem: quebra da dupla fita de DNA na junção entre um heptâmero e um segmento de codificação (RAG1/2)

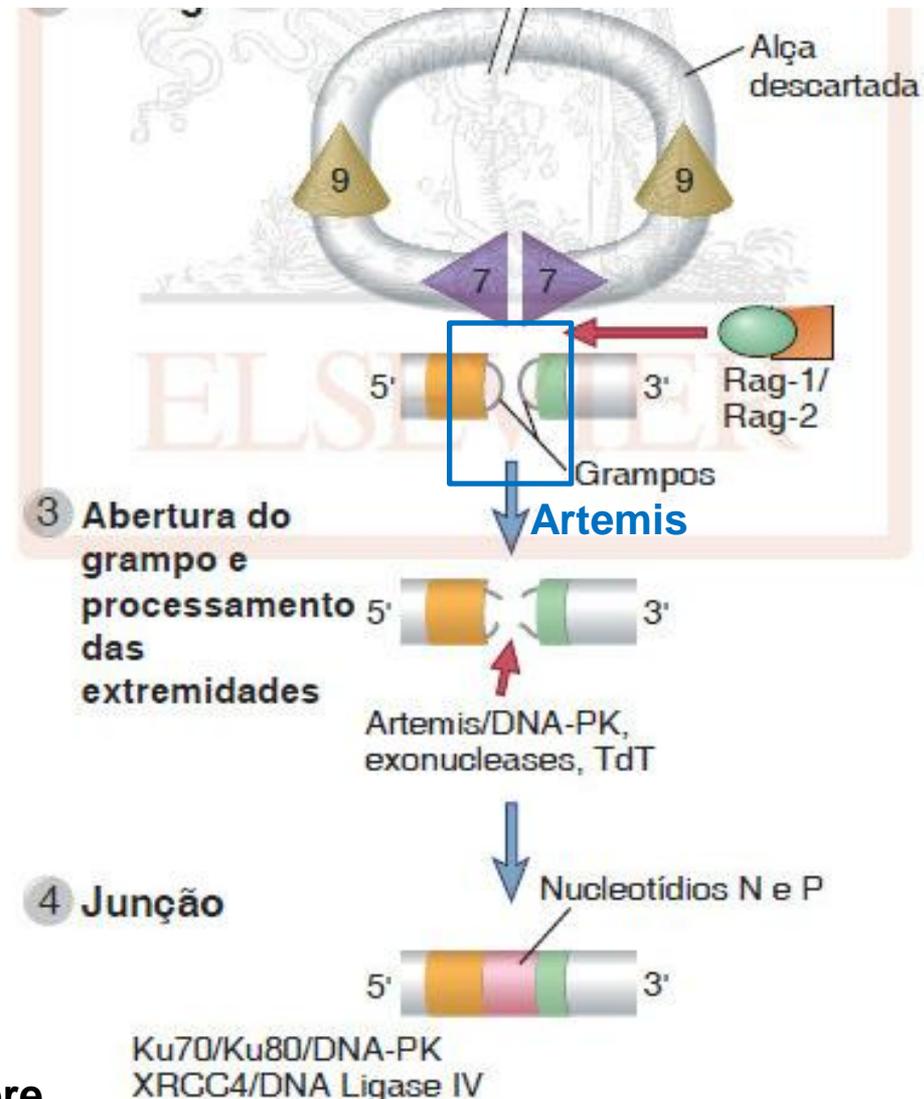


Eventos sequenciais: Abertura e junção

C) Abertura do grampo e processamento: mediada pela endonuclease Artemis e TdT acrescenta bases às extremidades quebradas

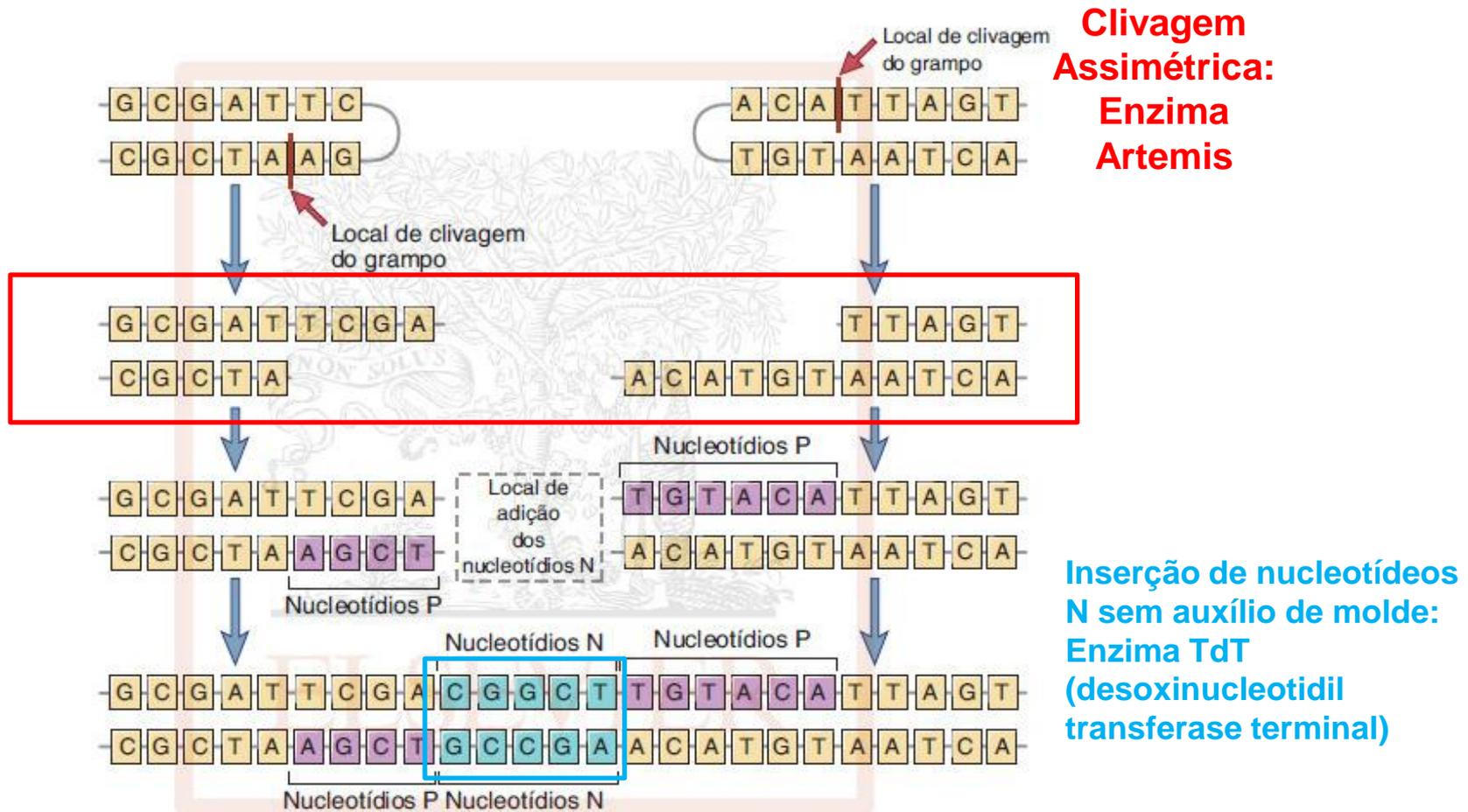
D) Junção: extremidades codificadoras clivadas são unidas por proteínas de ligação (reparo) como a DNA ligase IV

Enzima Artemis: é uma endonuclease que abre os grampos na regiões codificadoras



Diversidade juncional

É a variabilidade criada durante o processo de junção dos segmentos devida à inserção ou deleção de nucleotídeos.



**Clivagem
Assimétrica:
Enzima
Artemis**

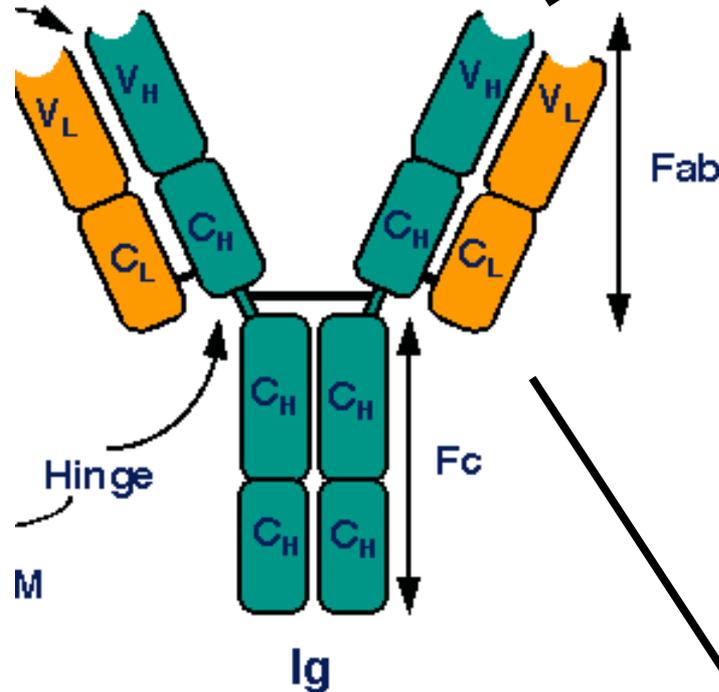
**Inserção de nucleotídeos
N sem auxílio de molde:
Enzima TdT
(desoxinucleotidil
transferase terminal)**

Nucleotídeos P: palindrômicos

Nucleotídeos N: não codificado pela fita-molde

Receptores de células Pré-B

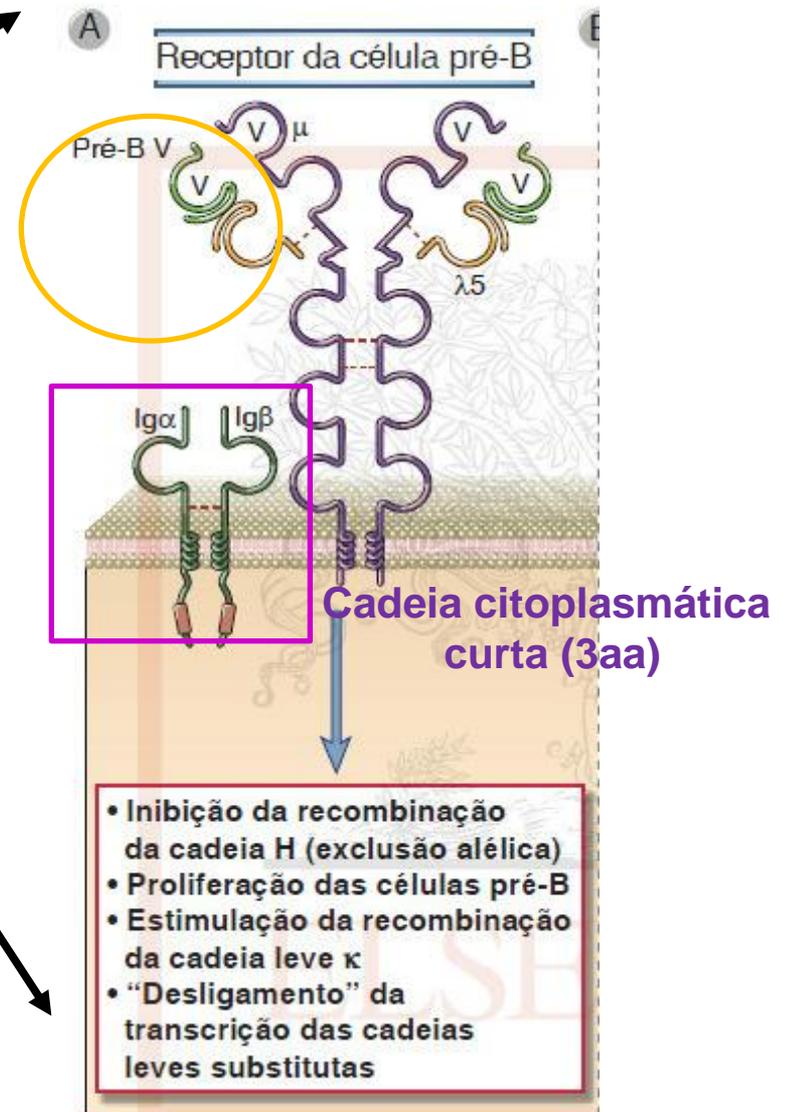
BCR: Formado por 4 cadeias (2 pesadas e 2 leves)



Cadeia pesada: 2 cadeias pesadas μ

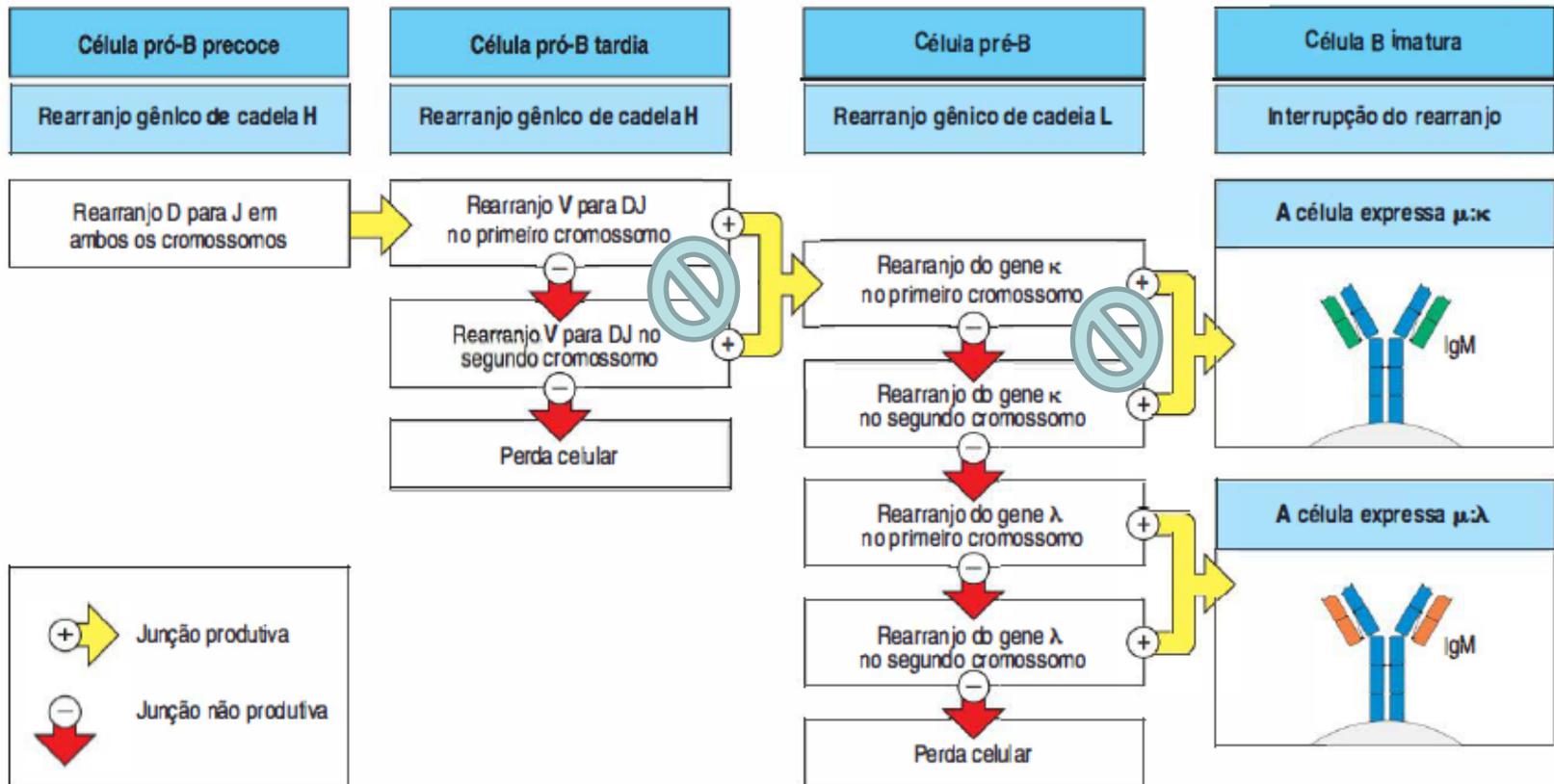
Cadeias leves substitutas: 2 cadeias pré-B $\lambda 5$ e V (não são variáveis)

Ig α e Ig β : proteínas de transdução de sinais

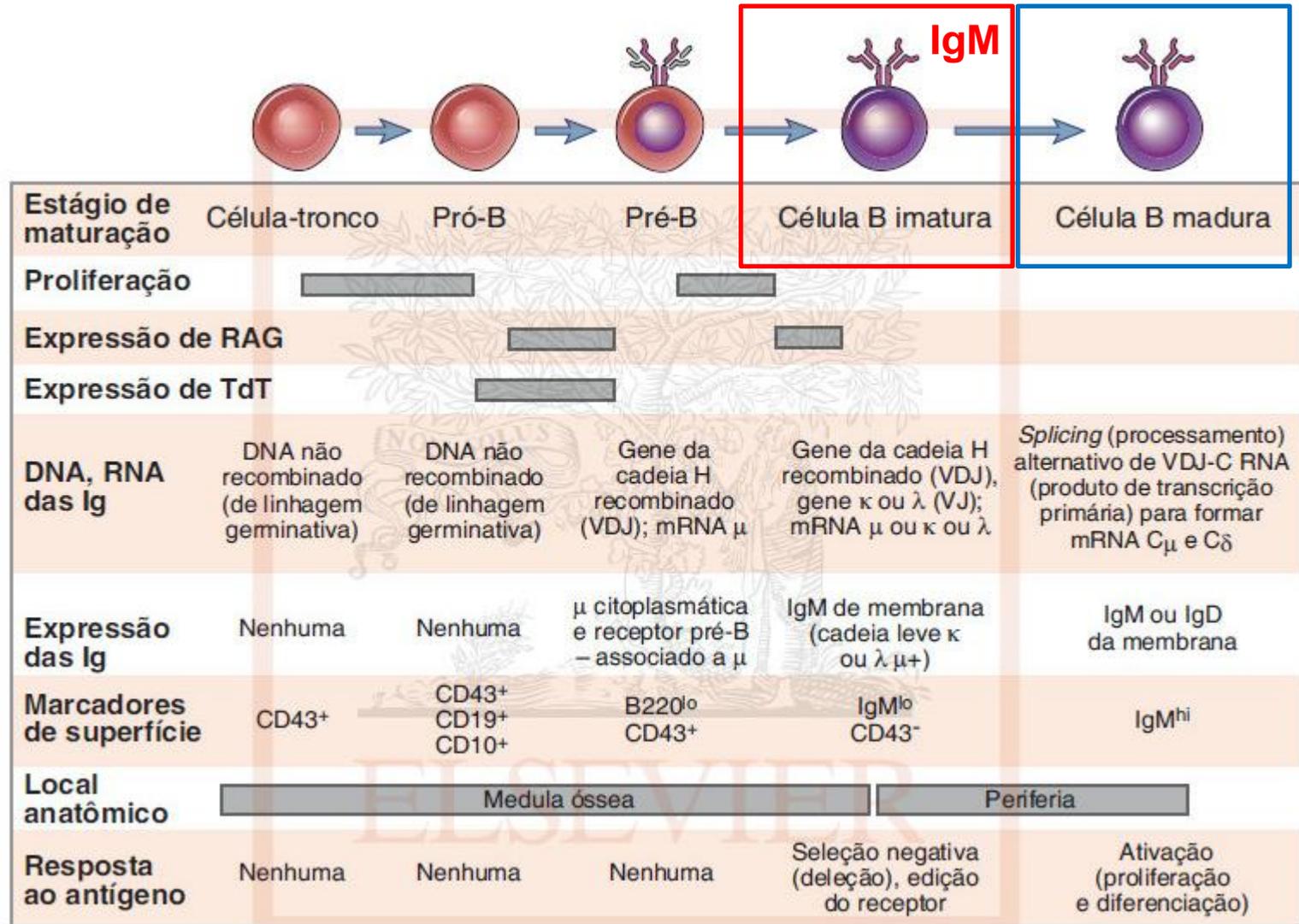


Exclusão alélica

É um estado no qual somente um dos dois alelos de um determinado gene (cadeia leve ou pesada) é expresso em uma célula diploide (expressão de um único receptor).

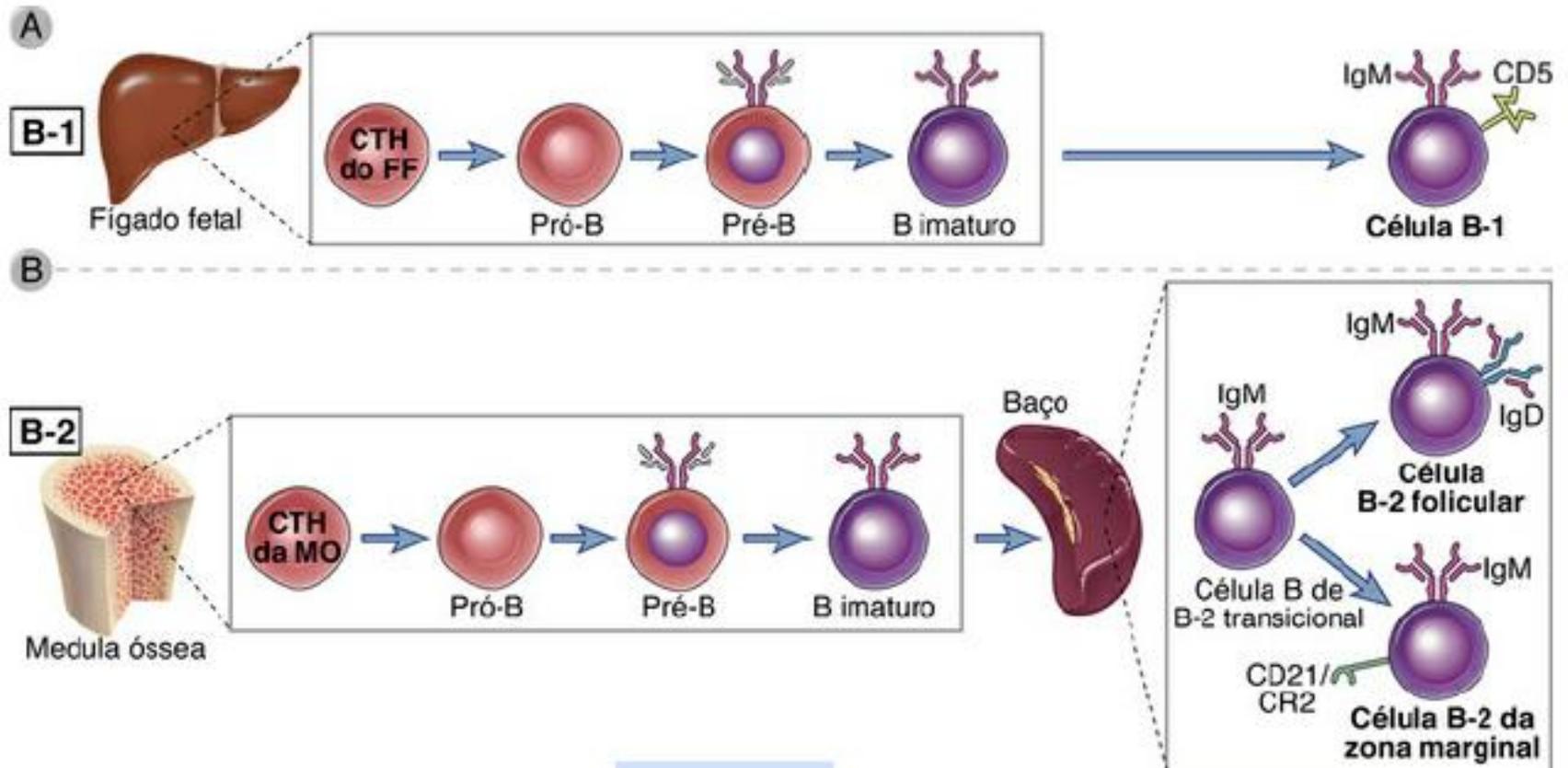


Estágios de maturação do linfócitos B: Célula B imatura



Linfócito B imaturo (inexperiente): Ocorre o rearranjo da cadeia leve (κ ou λ) e expressão do receptor BCR completo (IgM monomérica)

Subgrupos de linfócitos B (maduros)



Papel do timo: córtex e medula

É o principal local de maturação dos linfócitos T

Síndrome de DiGeorge (ausência congênita do timo em humanos) ou camundongos nude: deficiências graves da imunidade mediada por células T

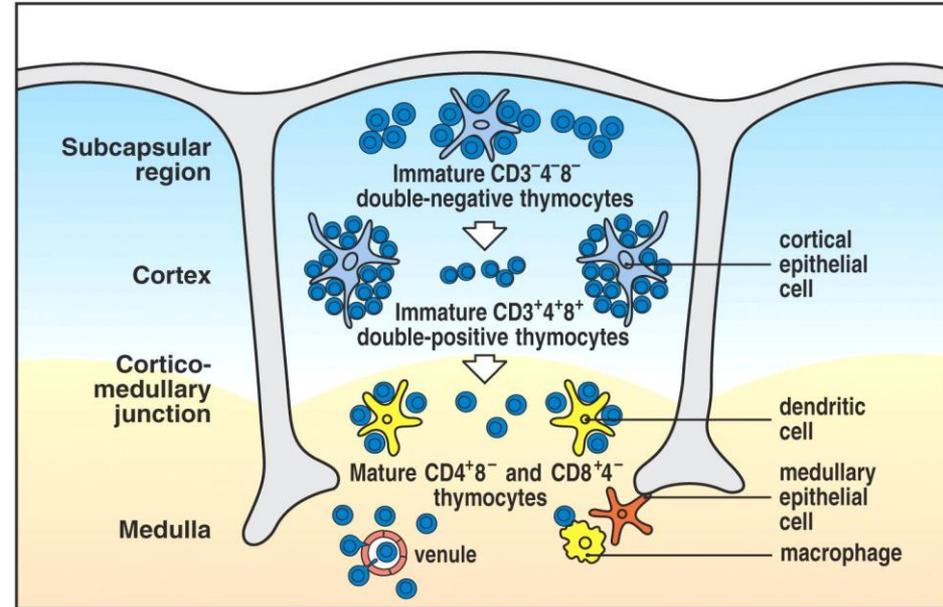


Figure 7-14 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

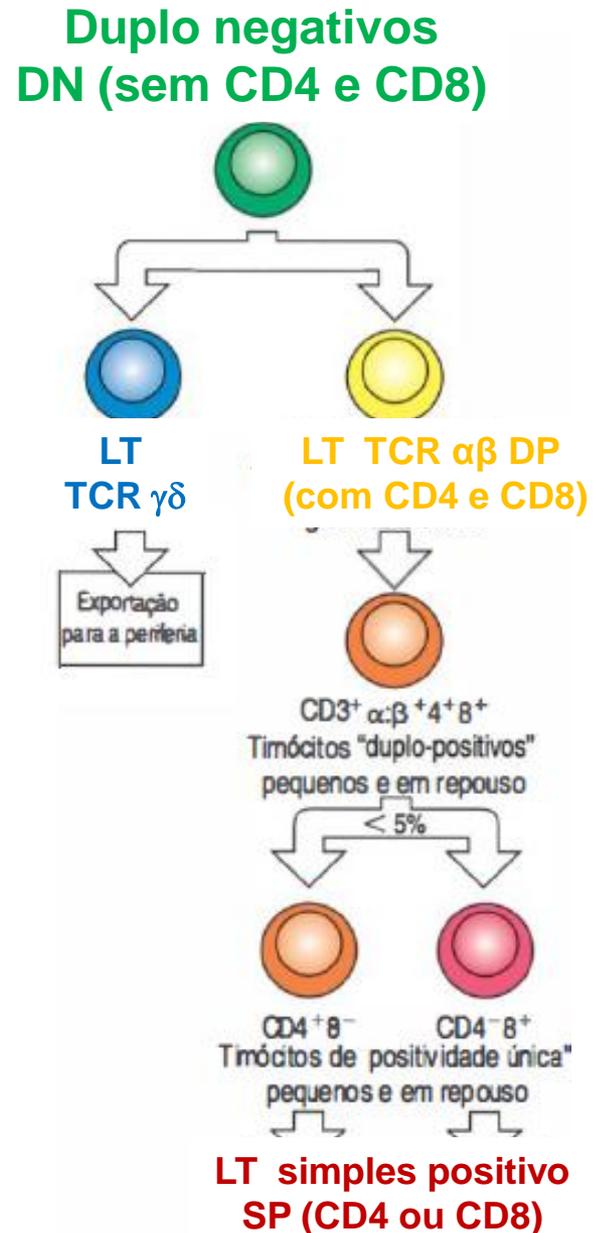
Involução do timo com a idade:
liberação relativamente reduzida de células T



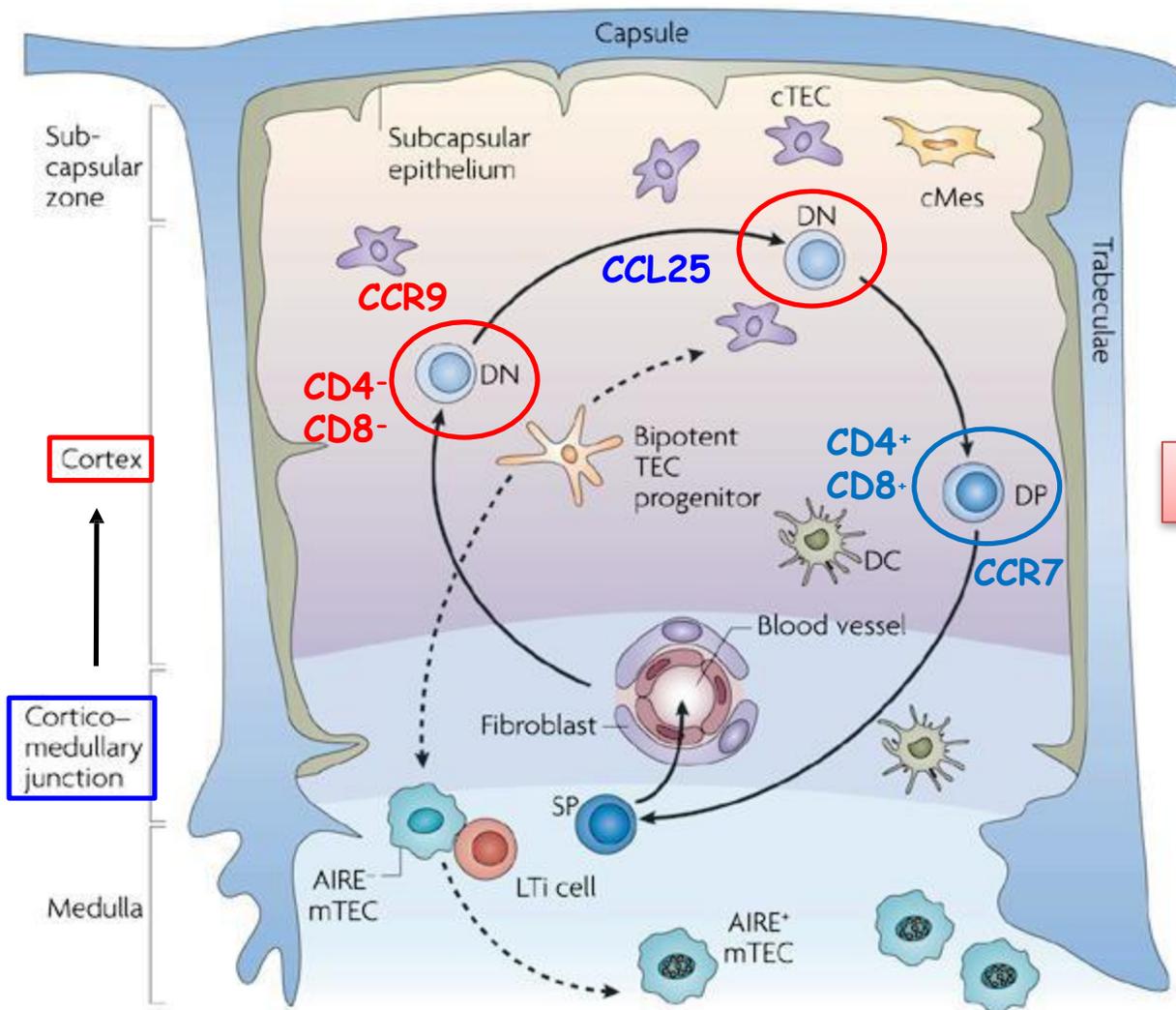
Estágios de maturação

- **Células T em desenvolvimento:** timócitos;
- **Região subcapsular:** timócitos duplo negativos DN (pró-T)
- **Região cortical:** LT TCR $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$ duplo positivos DP (CD4 e CD8);
- **Região medular:** timócitos simples-positivos SP CD4 ou CD8

IL-7: fator de crescimento linfopoiético (células do estroma tímico)



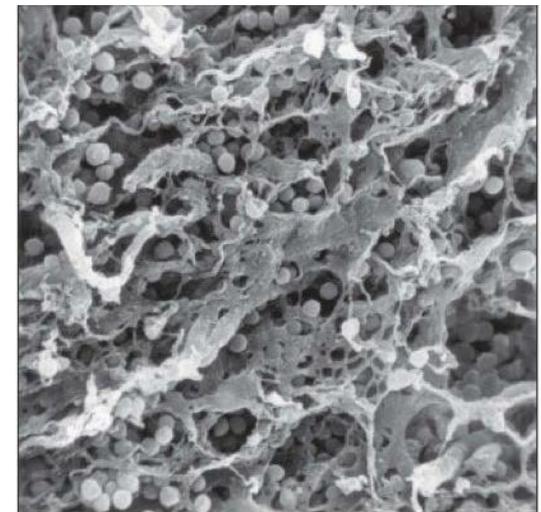
Maturação dos timócitos



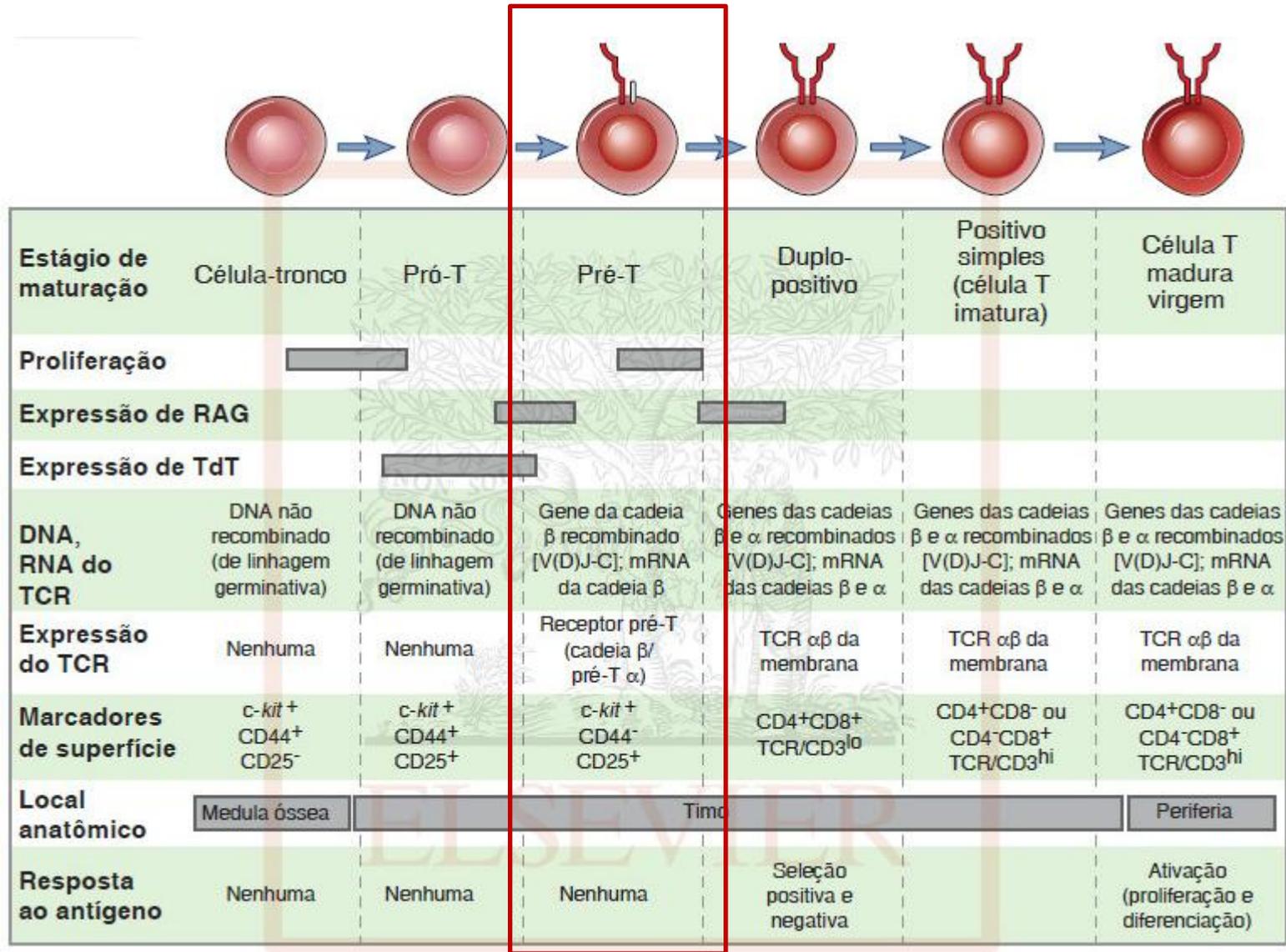
cTEC: células epiteliais corticais tímicas (MHC I e II)

mTEC: células epiteliais medulares tímicas

Expressão do TCR

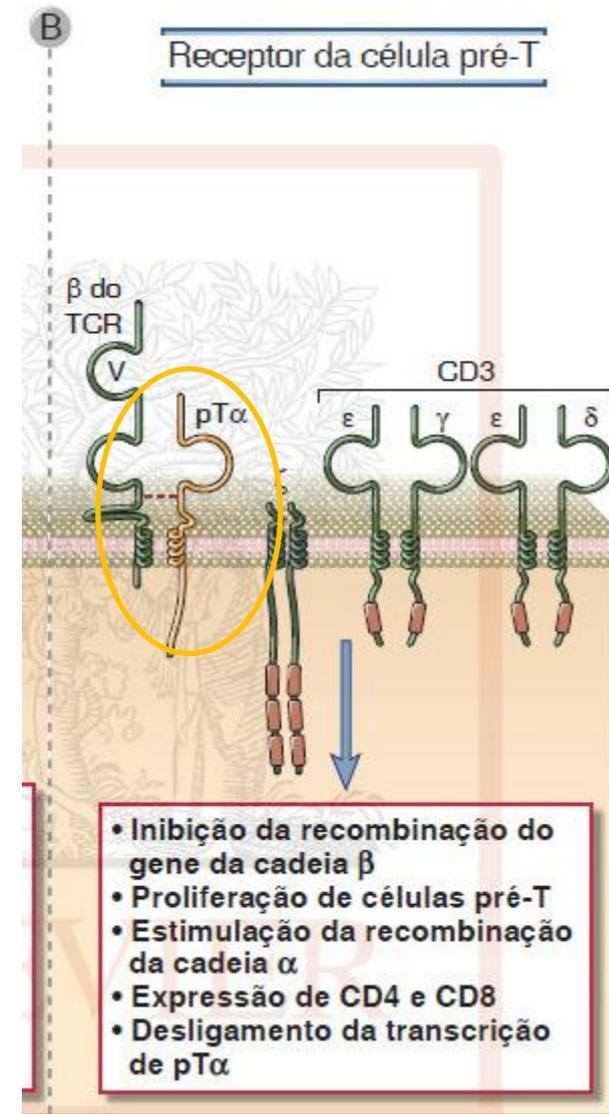
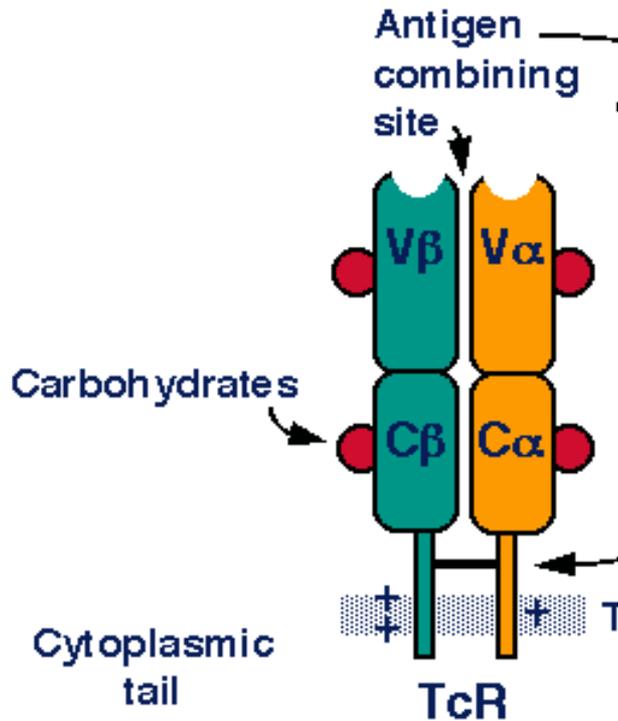


Estágios de maturação das células T: Pré-T



Os sinais do pré-TCR medeiam a sobrevivência das células pré-T que tenham rearranjado de maneira produtiva o gene da cadeia β

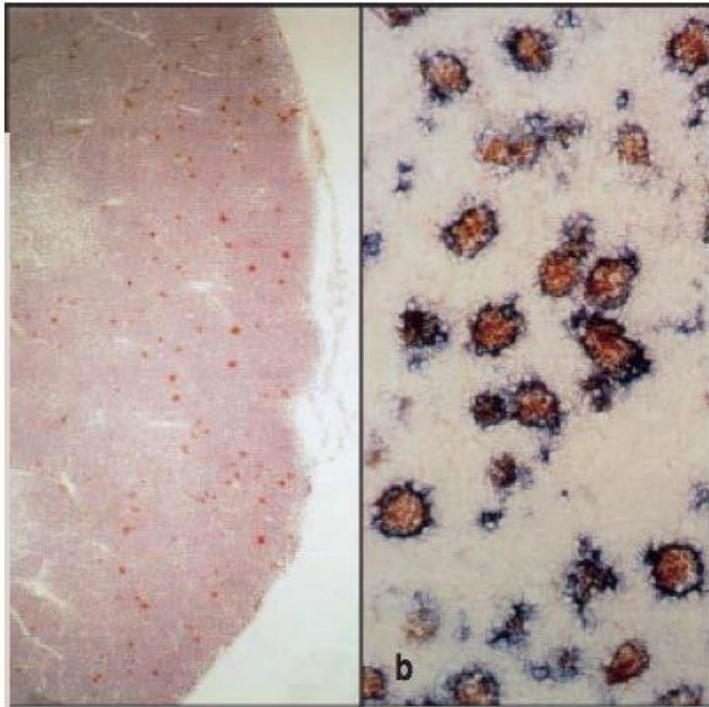
Receptor de linfócitos pré-T



Cadeia β definitiva

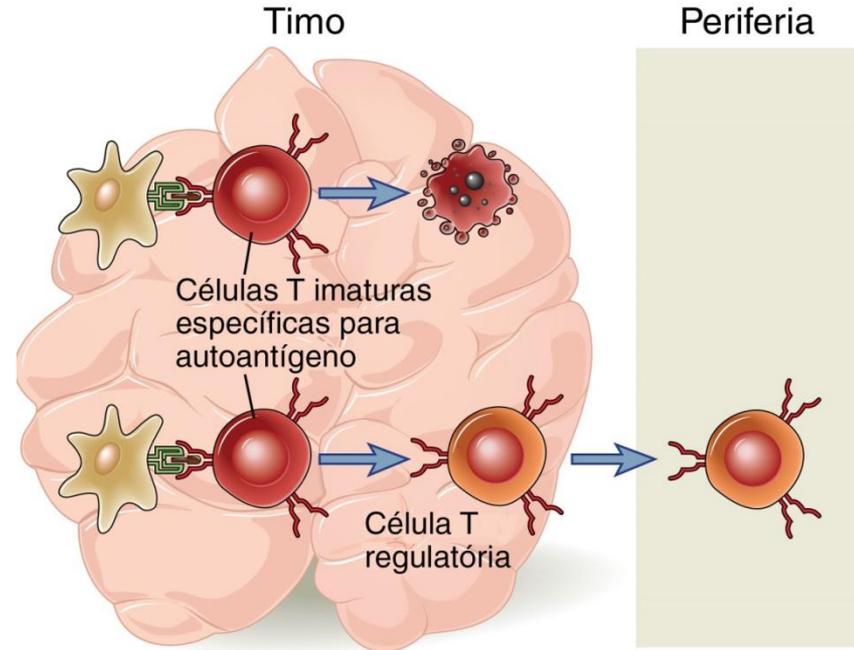
Cadeia α substituta: pT α , mas não apresenta variabilidade

Proliferação e Apoptose celular



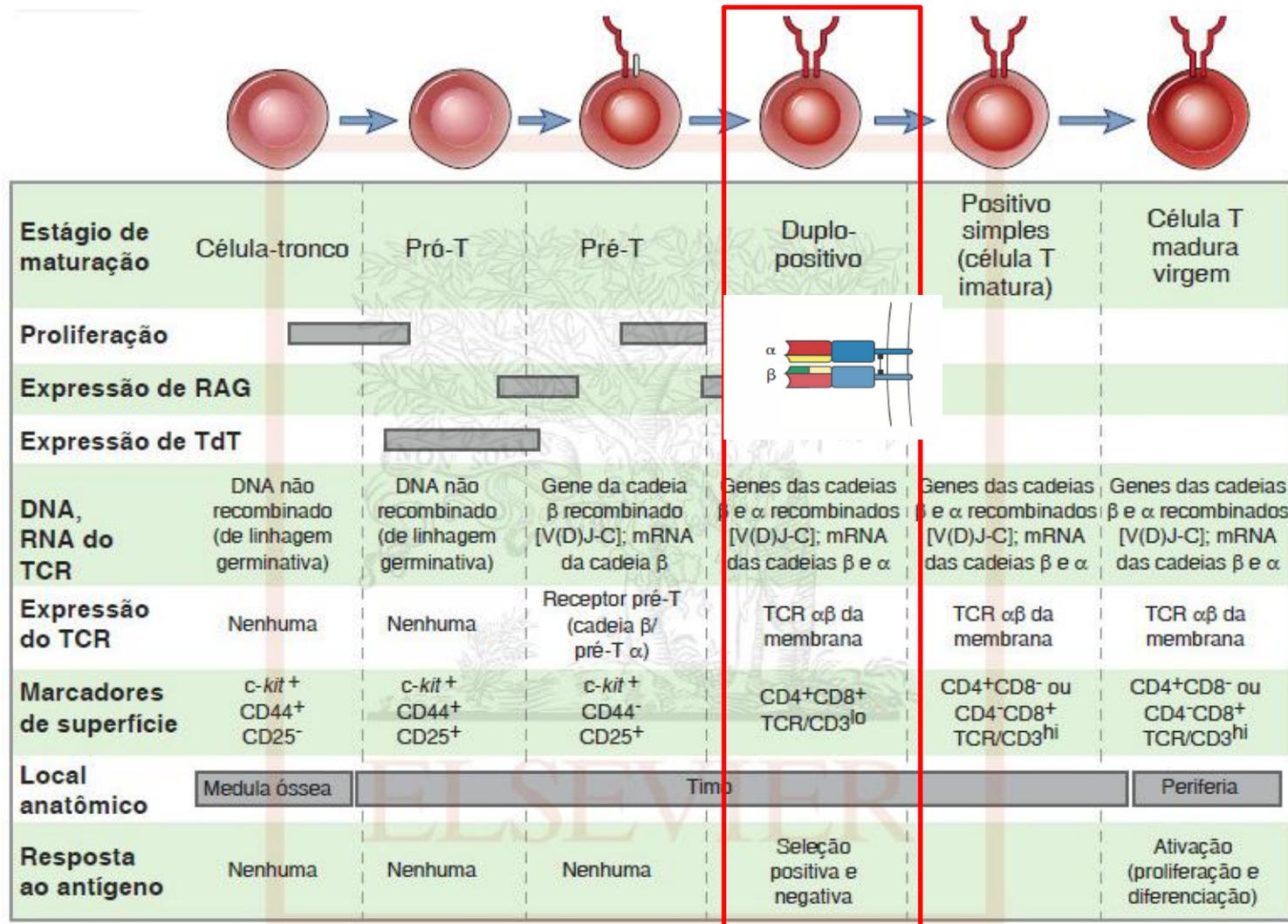
2×10^8 linfócitos no timo adulto

2×10^6 linfócitos



- 1) Incapacidade de rearranjar o gene da cadeia β do TCR
- 2) Não ser selecionada pelo processo de seleção positiva
- 3) Ser deletada pelo processo de seleção negativa

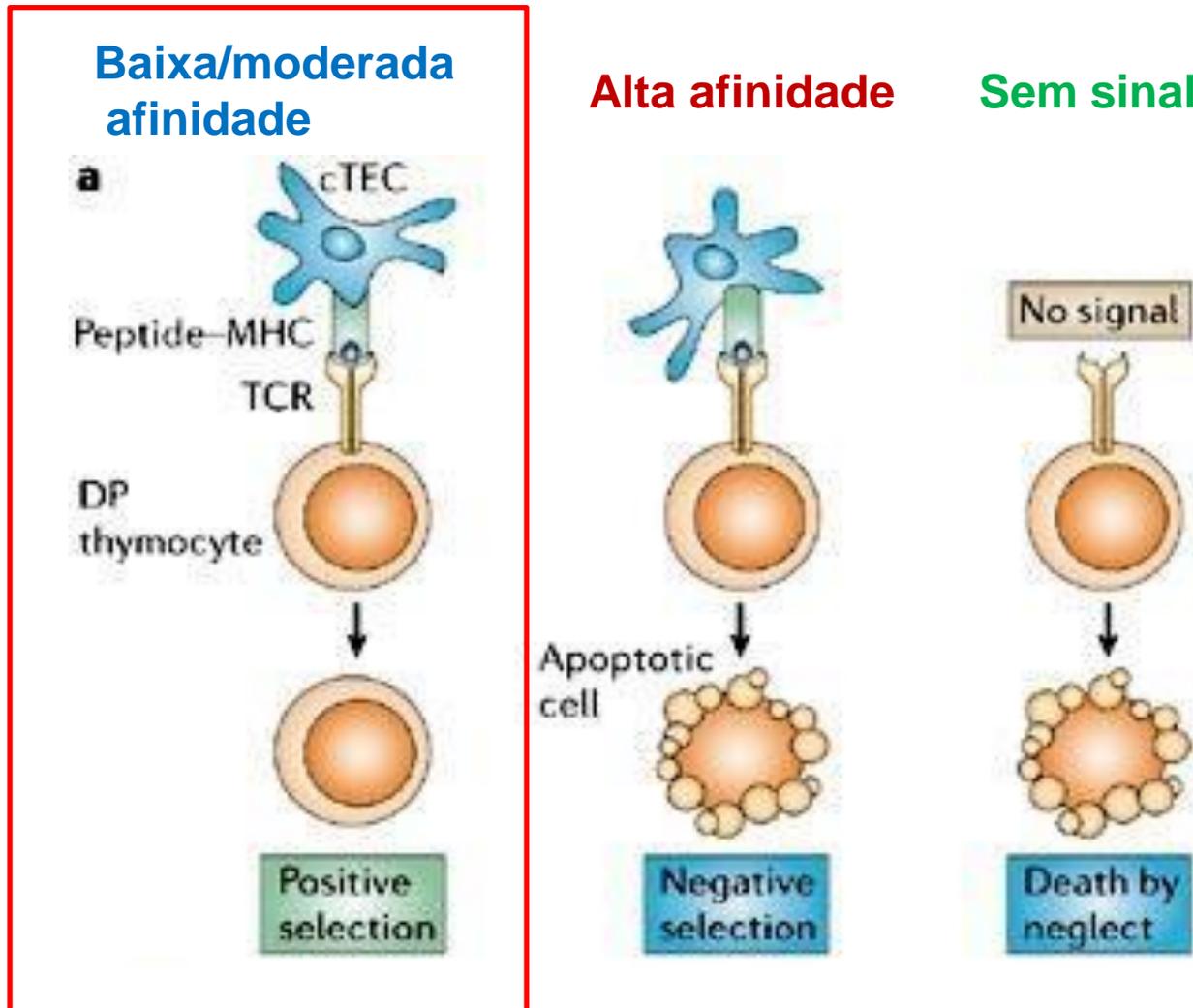
Estágios de maturação das células T: Duplo positivo



Estágio DP: Expressão dos co-receptores CD4 e CD8 e início do rearranjo do gene α do TCR resulta na expressão do TCR completo ($\alpha\beta$)

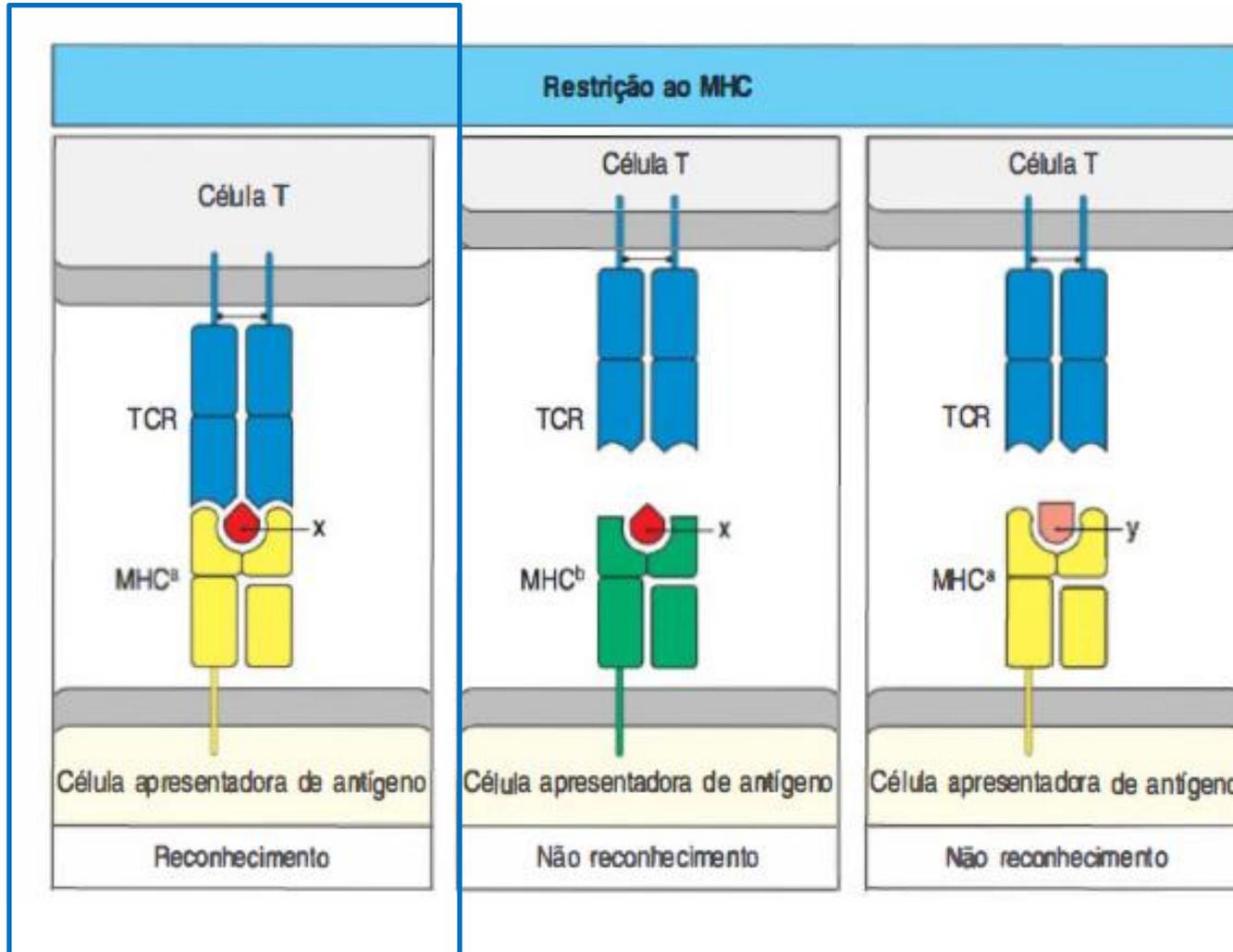
Seleção positiva de timócitos DP: córtex

É o processo que preserva as células T que reconhecem o MHC próprio
(restrição ao MHC) com baixa/moderada afinidade apresentados
por células epiteliais tímicas (córtex)



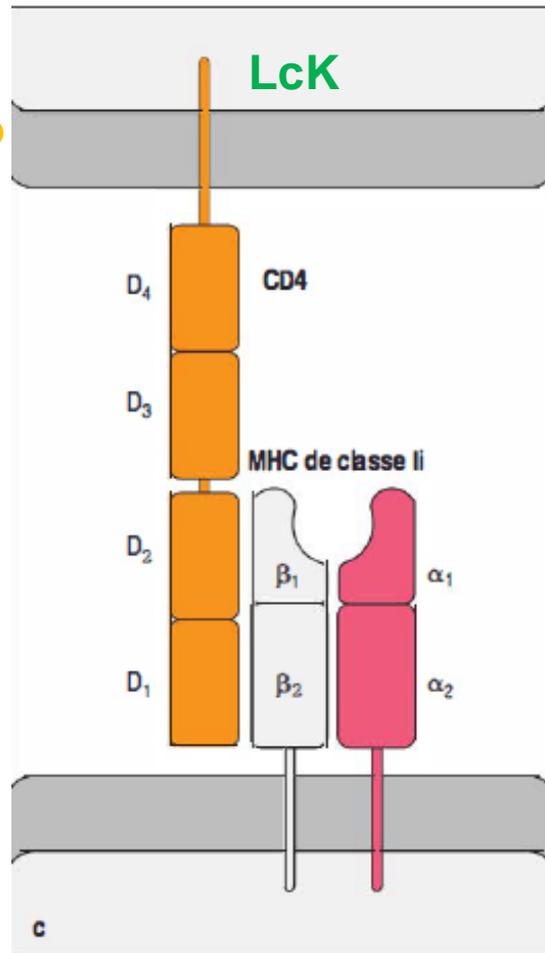
Restrição ao MHC

Restrição ao MHC: Os linfócitos T são capazes de reconhecer um peptídeo específico apresentado apenas por moléculas MHC próprias

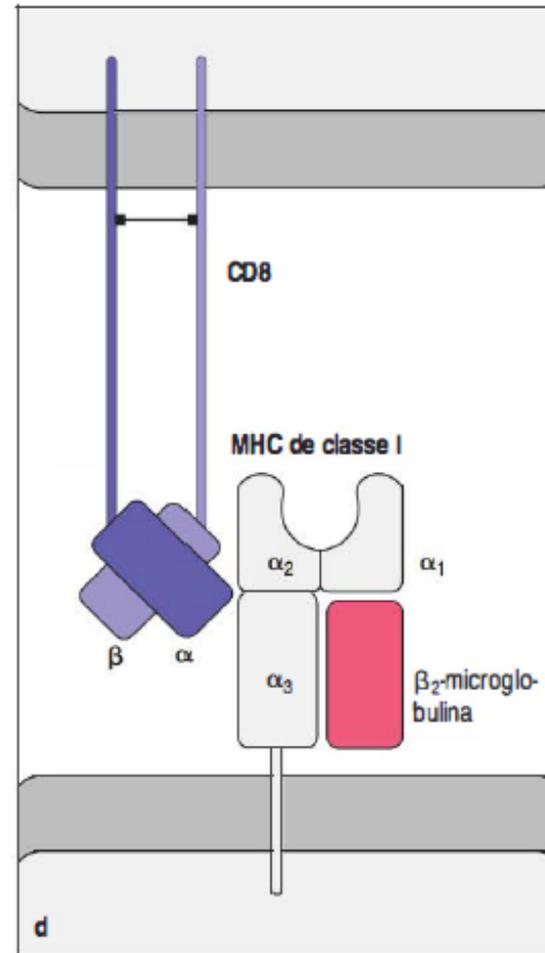


Ligação do co-receptores CD4 ou CD8: SP

CD4:
Homodímero
formada por
4 domínios:
MHC II



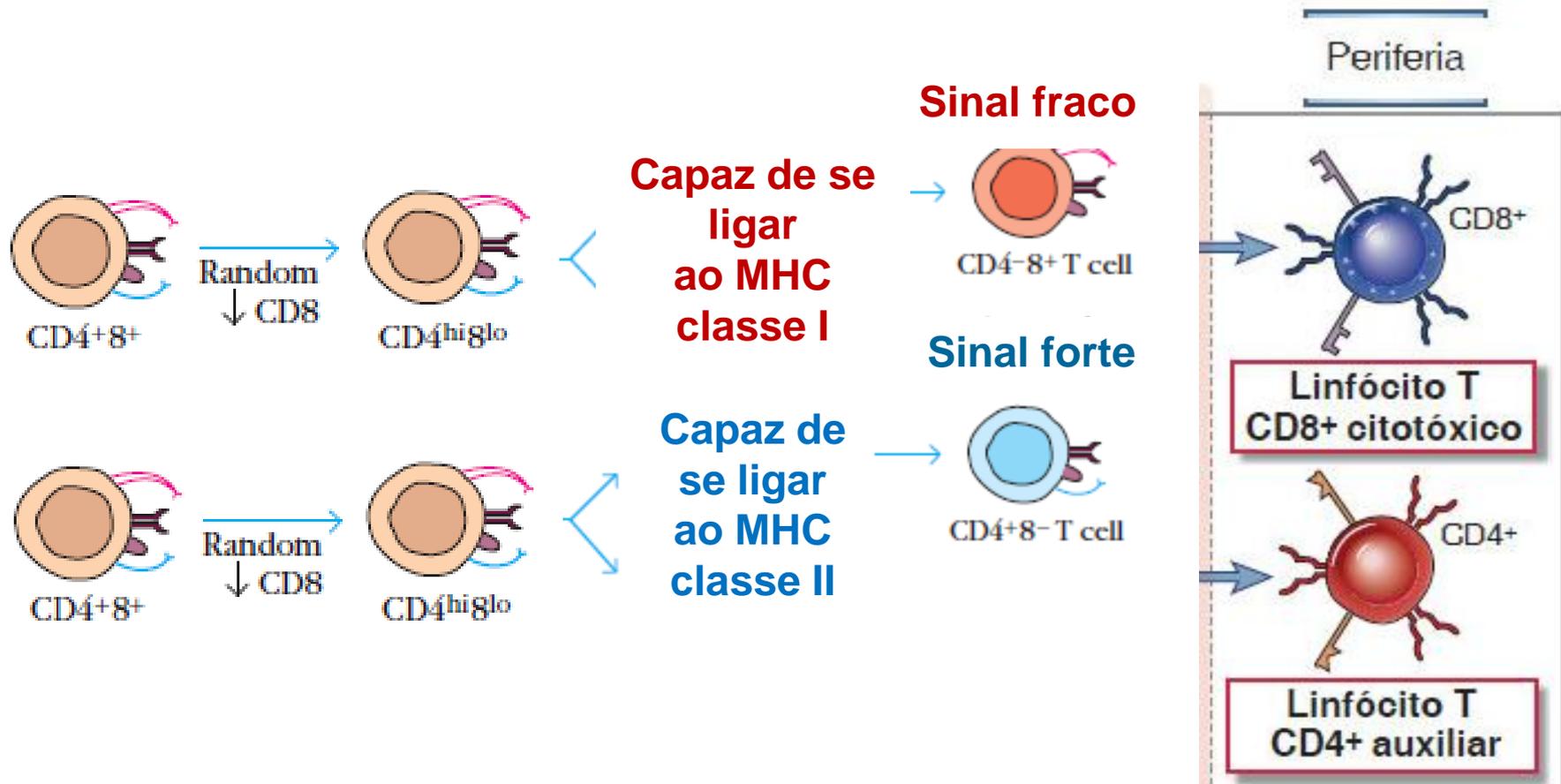
CD8:
Heterodímero
formado por
2 cadeias α e β:
MHC I



LcK: tirosina quinase citoplasmática que favorece sua aproximação dos outros componentes de sinalização do complexo do TCR

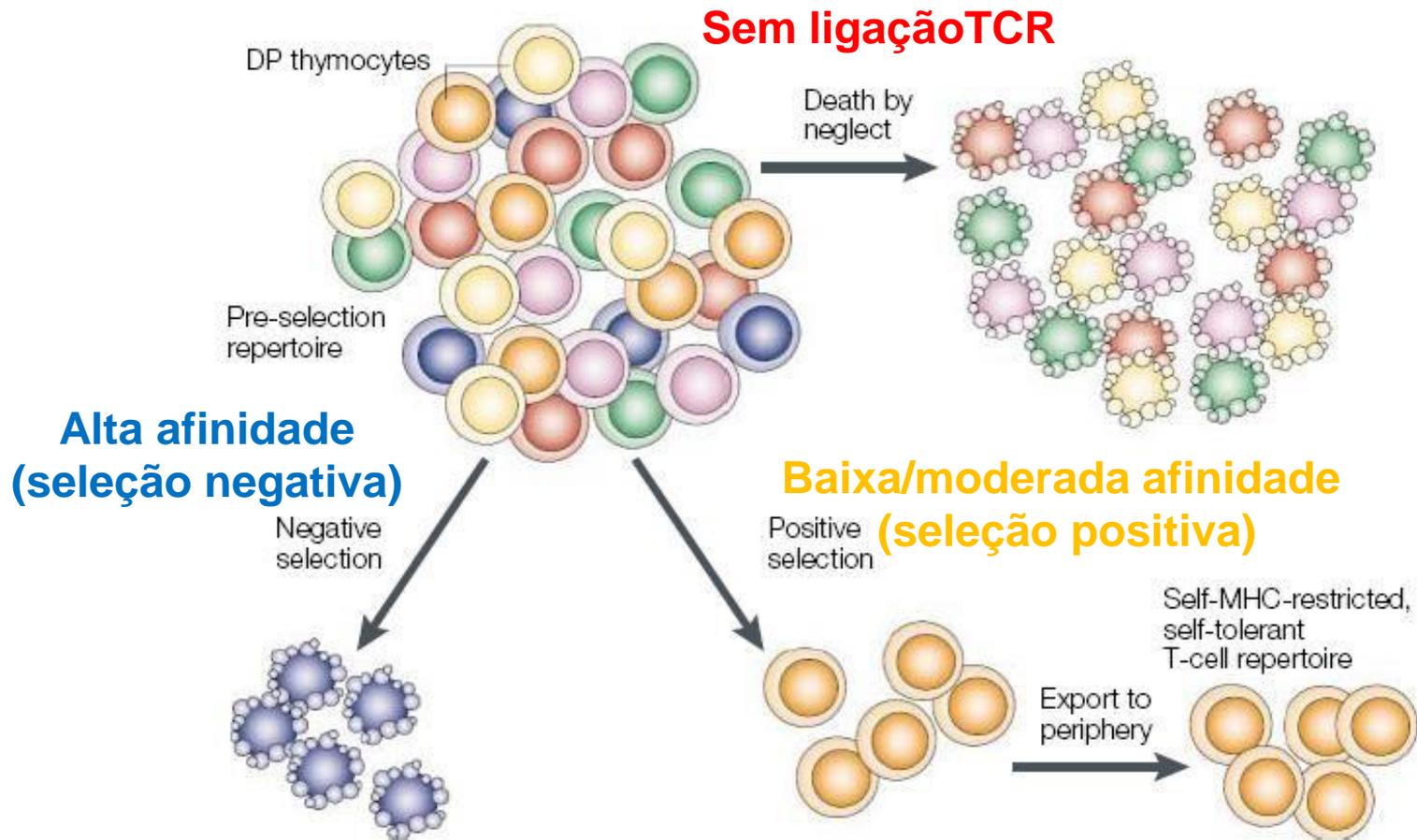
Comprometimento da linhagem CD4 ou CD8: SP

Teoria: Modelo de instrução



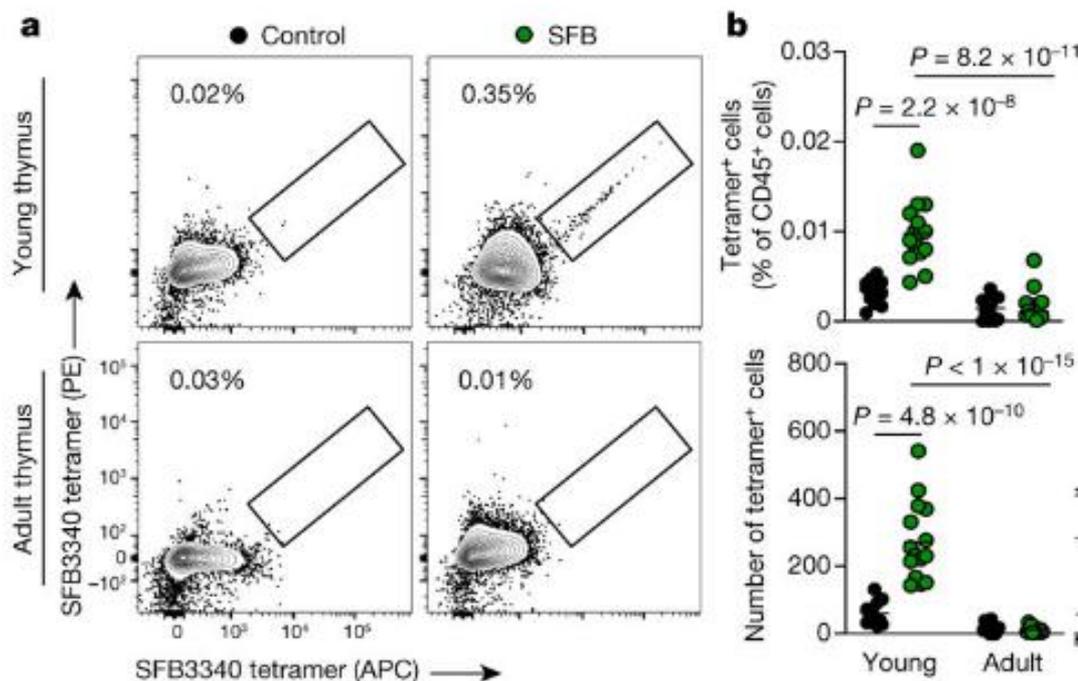
Seleção negativa

É o processo que elimina ou altera os linfócitos em desenvolvimento cujos receptores de antígenos ligam-se fortemente a antígenos próprios



Thymic development of gut-microbiota-specific T cells

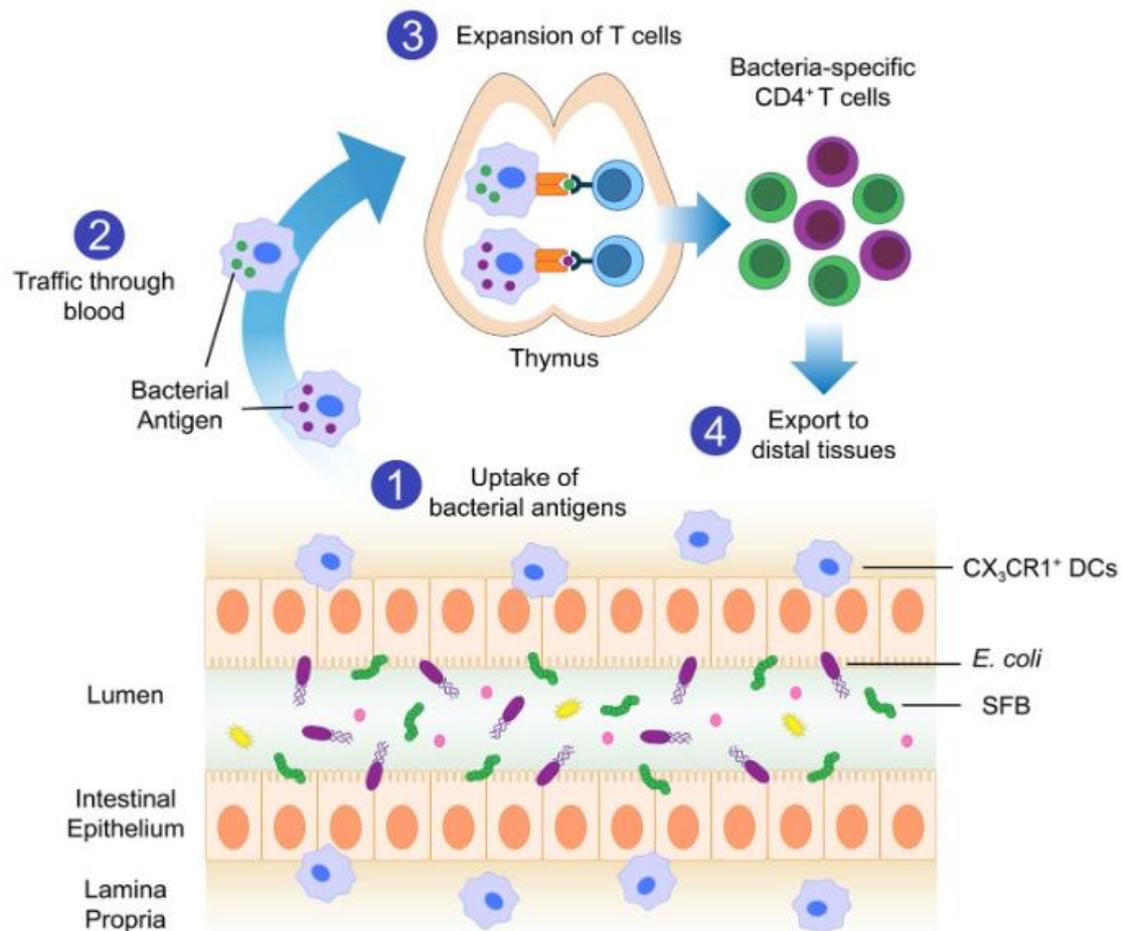
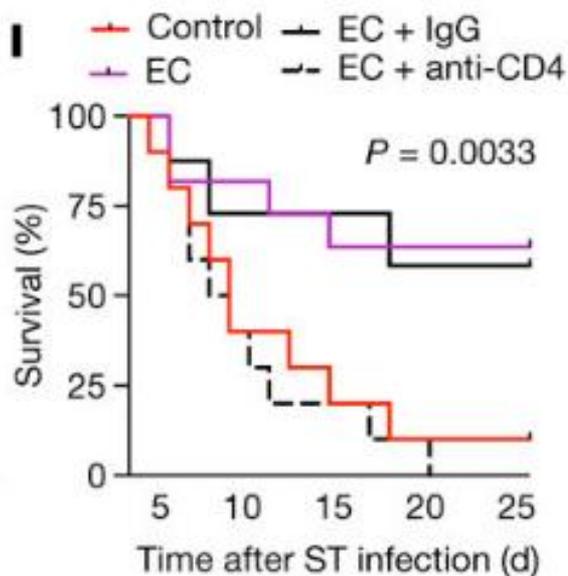
Daniel F. Zegarra-Ruiz¹, Dasom V. Kim^{1,2}, Kendra Norwood³, Myunghoo Kim^{3,12}, Wan-Jung H. Wu^{1,4}, Fatima B. Saldana-Morales^{1,5}, Andrea A. Hill⁶, Shubhabrata Majumdar^{4,7}, Stephanie Orozco⁷, Rickesha Bell⁷, June L. Round⁷, Randy S. Longman^{8,9,10}, Takeshi Egawa¹¹, Matthew L. Bettini⁷, Gretchen E. Diehl^{1,2,3}



Colonização com *E. coli* ou SFB (segmented filamentous bacteria)

Thymic development of gut-microbiota-specific T cells

Daniel F. Zegarra-Ruiz¹, Dasom V. Kim^{1,2}, Kendra Norwood³, Myunghoo Kim^{3,12}, Wan-Jung H. Wu^{1,4}, Fatima B. Saldana-Morales^{1,5}, Andrea A. Hill⁶, Shubhabrata Majumdar^{4,7}, Stephanie Orozco⁷, Rickesha Bell⁷, June L. Round⁷, Randy S. Longman^{8,9,10}, Takeshi Egawa¹¹, Matthew L. Bettini⁷, Gretchen E. Diehl^{1,2,3}



REFERÊNCIAS

✓ **Leitura principal:**

Imunologia Celular e Molecular. Abul K. Abbas e Andrew H. Lichtman. 8ª Edição, 2005

Capítulo 8: Desenvolvimento de linfócitos e rearranjo dos genes dos receptores de antígenos (Pag. 171 a 198)

✓ **Leitura complementar:**

Imunobiologia – o sistema imune na saúde e na doença. Charles A. Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport e Mark J. Shlomchik. 8ª Edição, 2007

Capítulo 5: Geração de Receptores de Antígenos dos Linfócitos

Capítulo 8: Desenvolvimento e Sobrevivência dos Linfócitos